

Lea Sophie Herges

Molekulare Analysen der Wirkung von Anthocyanen
und antimikrobiellen Peptiden aus Insekten auf das
Wachstum von *Listeria monocytogenes* und
pathogenen *Escherichia coli*



INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanbiologie
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



edition scientifique
VVB LAUFFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2014

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2014

© 2014 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Molekulare Analysen der Wirkung von Anthocyanen
und antimikrobiellen Peptiden aus Insekten
auf das Wachstum von
Listeria monocytogenes und
pathogenen *Escherichia coli***

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des
Grades eines Doktors der Humanbiologie
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Lea Sophie Herges

aus Filderstadt



Gießen, 2014

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Trinad Chakraborty,
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Gießen

Betreuer: Herr Prof. Dr. Eugen Domann

Gutachter: Prof. Dr. Eugen Domann

Gutachter: Prof. Dr. Gabriele Klug

Tag der Disputation: 23. Oktober 2014

Für meine Großeltern Ursula, Hans, Helene und Bernhard

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Bakterien - Gegensätze zwischen physiologischer Mikrobiota und Pathogenen	2
1.2	Bedeutung von reaktiven Sauerstoffspezies bei der Antibiotikatherapie	7
1.2.1	Bildung und Wirkungen von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)	7
1.2.2	Einfluss von Eisen auf die Bildung von ROS	8
1.2.3	Eisenaufnahme und -speicherung in <i>L. monocytogenes</i> und <i>E. coli</i>	9
1.3	Problematik der Antibiotikaresistenzen	11
1.4	Potenziell antiinfektive Substanzen gegen multiresistente Krankheitserreger	12
1.4.1	Anthocyane aus Pflanzenextrakten	13
1.4.1.1	Herkunft (Traube, Holunder, Heidelbeere)	13
1.4.1.2	Einteilung, Struktur und Aufbau	14
1.4.1.3	Funktionen in Pflanzen	16
1.4.1.4	Aufnahme, Metabolismus und ernährungsphysiologische Relevanz	17
1.4.2	Antimikrobielle Peptide (AMP) aus Insekten	19
1.4.2.1	Herkunft	19
1.4.2.2	Einteilung, Struktur und Aufbau	19
1.4.2.3	Wirkmechanismen der AMP	20
1.5	Invertebraten-Infektionsmodell <i>Galleria mellonella</i>	21
2	Zielsetzung dieser Arbeit	25
3	Material und Methoden	26
3.1	Material	26
3.1.1	Bakterienstämme	26
3.1.2	Larven der Großen Wachsmotte <i>G. mellonella</i>	26
3.1.3	Bereitstellung der Pflanzenextrakte	27
3.1.4	Bereitstellung der Insektenpeptide	27
3.1.5	Bereitstellung des Humanserums	28
3.1.6	Chemikalien	28
3.1.7	Flüssignährmedien und Agarplatten	30
3.1.8	Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien	30
3.1.9	Geräte	31
3.2	Methoden	32
3.2.1	Steriles Arbeiten und Sicherheitsmaßnahmen	32
3.2.2	Kultivierung der Bakterien	32
3.2.3	Bestimmung der Lebendzellzahlen	33
3.2.4	Vorbereitung der Pflanzenextrakte	33
3.2.5	Vorbereitung der Insektenpeptide	34
3.2.6	Messung der optischen Dichte	34
3.2.7	Umgang und Infektion von Larven der <i>G. mellonella</i>	35
3.2.8	Genexpressionsanalyse	36
3.2.8.1	RNA-Isolierung	36
3.2.8.2	Bestimmung der RNA-Konzentration und RNA-Reinheit	37

3.2.8.3	Next generation sequencing (NGS) mit dem Ion Personal Genome Machine® (PGM™) System	38
3.2.8.4	cDNA-Synthese.....	39
3.2.8.5	Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)	40
3.2.9	Nachweis der Beta-Glukosidase-Aktivität.....	42
3.2.10	Umgang mit Hämozyten aus <i>G. mellonella</i>	43
3.2.10.1	Isolierung der Hämozyten	43
3.2.10.2	Infektion der Hämozyten	43
3.2.10.3	Fluoreszenzfärbung der Hämozyten.....	44
3.2.11	Fluoreszenzmikroskopie.....	44
3.2.12	Untersuchung des <i>viable-but-not-culturable</i> (VBNC)-Zustandes	45
3.2.12.1	Untersuchung der Resistenzstabilität	45
3.2.12.2	Live-dead-staining.....	45
3.2.13	Fluorescence activated cell sorting (FACS)-Analyse	46
3.2.14	Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)	47
3.2.15	Statistische Auswertung	48
4	Ergebnisse	50
4.1	In vitro-Versuche mit potenziell antimikrobiellen Substanzen	50
4.1.1	Einfluss Anthocyan-haltiger Beerenextrakte auf das Wachstum von Bakterien.....	50
4.1.1.1	Screening der Beerenextrakte.....	50
4.1.1.2	Dosis-Wirkungs-Effekte.....	51
4.1.1.3	Bestimmung der Lebendzellzahlen	53
4.1.2	Einfluss von AMP auf das Wachstum verschiedener Bakterien	53
4.1.2.1	Screening der Peptide.....	53
4.1.2.2	Dosis-Wirkungs-Effekte.....	56
4.2	In vivo-Versuche mit potenziell antimikrobiellen Substanzen.....	59
4.2.1	<i>G. mellonella</i> als alternatives Infektionsmodel zur Untersuchung von Pathogenität bei Bakterien	59
4.2.2	Infektionsversuche in <i>G. mellonella</i> mit Anthocyan-haltigen Beerenextrakten.....	60
4.2.3	Infektionsversuche in <i>G. mellonella</i> mit wirksamen AMP	62
4.3	Transkriptomanalyse mittels NGS.....	63
4.3.1	Einfluss von <i>Dakapo</i> auf das Wachstum von <i>L. monocytogenes</i>	63
4.3.1.1	Metabolische Genexpression	66
4.3.1.2	Stressantwort und DNA-Reparatur	67
4.3.1.3	Eisenspeicherung.....	68
4.3.1.4	Transportsysteme	68
4.3.1.5	Sonstige transkriptionelle Veränderungen.....	69
4.3.2	Einfluss von <i>Dakapo</i> auf das Wachstum des enteroaggregativen-hämorrhagischen <i>E. coli</i> (EAHEC, 2011).....	70
4.3.2.1	Metabolische Genexpression	73
4.3.2.2	Stressantwort und DNA-Reparatur	74
4.3.2.3	Eisenspeicherung.....	74
4.3.2.4	Transportsysteme	74
4.3.2.5	Sonstige transkriptionelle Veränderungen.....	75

4.4	Verifizierung der Transkriptomanalyse bei <i>L. monocytogenes</i> und EAHEC mittels qRT-PCR	76
4.5	Mechanismen für die Wachstumsinhibition durch <i>Dakapo</i> in <i>L. monocytogenes</i>	77
4.5.1	Beta-Glukosidase-Assay	77
4.5.2	Effekt von Sauerstoff auf die <i>Dakapo</i> -Wirkung	77
4.5.3	Effekt unterschiedlicher Kohlenhydratquellen im Minimalmedium	78
4.5.4	Effekt von <i>Dakapo</i> auf das Wachstum verschiedener Mutanten	79
4.5.5	Untersuchungen zu oxidativem Stress	81
4.5.6	Effekt isolierter Anthocyane	81
4.5.7	Effekt einer Eisensupplementierung	83
4.5.8	Effekt von Catechol und verschiedenen Antibiotika	84
4.5.9	Wirkung des Peptides LL-37	85
4.6	Mechanismen für die Wachstumsinduktion durch <i>Dakapo</i> in EAHEC	86
4.6.1	Untersuchungen zu oxidativem Stress	86
4.6.2	Effekt isolierter Anthocyane	88
4.6.3	Effekt einer Eisensupplementierung	89
4.6.4	Untersuchungen zur Serumresistenz in Kombination mit <i>Dakapo</i>	89
4.7	Untersuchung des VBNC-Zustandes von <i>E. coli</i> in verschiedenen Gewässern	91
4.7.1	Bestimmung der Lebendzellzahlen	91
4.7.2	Live-Dead-Staining	92
4.7.3	Effekt von <i>Dakapo</i> auf den VBNC-Zustand	92
4.7.1	Untersuchungen zur Resistenzstabilität	93
4.8	Zellkultur mit Insektenzellen aus <i>G. mellonella</i>	94
4.8.1	Hämozyten aus <i>G. mellonella</i>	94
4.8.2	Infektion von Hämozyten mit verschiedenen Bakterien	95
5	Diskussion	97
5.1	Problemstellung	97
5.2	Effekte der AMP	99
5.3	Effekte der Anthocyane	103
5.4	Ausblick	119
6	Zusammenfassung	121
7	Summary	122
8	Abkürzungsverzeichnis	123
9	Abbildungsverzeichnis	126
10	Tabellenverzeichnis	128
11	Literaturverzeichnis	129
12	Glossar	141
13	Anhang	143
14	Publikationsverzeichnis	151
15	Ehrenwörtliche Erklärung	152
16	Danksagung	153

1 Einleitung

Die Menschen in den Industrienationen erwarten heute Lebensmittel, die immer gut aussehen, gleichbleibend wohlschmecken, leicht und schnell zuzubereiten und kostengünstig sind. Die Industrie hat auf diese Präferenzen reagiert und produziert, was die Verbraucher wünschen. Zur Sicherstellung der gewohnten Optik und eines einheitlichen Geschmacks werden standardisierte Zusatzstoffe (*Food Additives*) wie Farb-, Aroma- und Konservierungsstoffe, Antioxidantien, Säureregulatoren, Süßungsmittel, Emulgatoren, Geschmacksverstärker und Stabilisatoren verwendet, zu denen Bewertungen und Listen existieren. In der Europäischen Union gibt es z.B. die Systematik der E-Nummern (*European Food Safety Authority*, EFSA, 2013), in den USA die „*Generally recognized as safe* (GRAS)“-Liste der *Food and Drug Administration* (FDA, 2013). Gerade bei hochwertigen Lebensmitteln, wie Fleischprodukten, wird viel Geld verdient und der Kostendruck ist immens. Das führt zu komplett abgeschotteten Mastbetrieben, wo z.B. Rinder, Schweine und Geflügel unter engen Bedingungen gehalten werden und Krankheiten nicht ausbleiben. Deswegen werden in diesen Massentierzuchtbetrieben Antibiotika eingesetzt, um Infektionen der Tiere zu vermeiden. Klassische Krankheitserreger, die durch Lebensmittel übertragen werden können, sind: Salmonellen, *Campylobacter*, enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC), *Yersinia enterocolitica*, Shigellen, *Vibrio cholerae*, *Listeria monocytogenes* und *Staphylococcus aureus*. Bei einigen dieser Pathogene, wie z.B. *E. coli* und *S. aureus* hat der starke Einsatz von Antibiotika in der Landwirtschaft und Medizin zur Resistenzentwicklung geführt und es sind multiresistente Erreger (MRE) entstanden (Kap. 1.3). In Zeiten einer alternden Gesellschaft, die ebenso immer mehr immungeschwächte Individuen hervorbringt, stellen diese MRE eine potenzielle Gefahr dar. MRE werden meist von Patienten ins Krankenhaus mitgebracht, durch Lebensmittel übertragen und gefährden weitere Personen. Die Therapieoptionen sind aufgrund der Multiresistenz stark eingeschränkt, zumal keine neuen Antibiotika in Sicht sind. Die Industrie hat die Antibiotikaforschung praktisch eingestellt, so dass die Regierungen durch gezielte Fördermaßnahmen versuchen, Alternativen zu entwickeln. Förderprojekte in diesem Bereich stellen z.B. DART (Deutsche Antibiotika Resistenzstrategie) oder der LOEWE-Schwerpunkt Insektenbiotechnologie (Land Hessen) dar, im Rahmen dessen die vorliegende Arbeit entstanden ist. Zum einen soll die Verbreitung der MRE eingeschränkt, zum anderen alternative Antiinfektiva gefunden werden.

1.1 Bakterien - Gegensätze zwischen physiologischer Mikrobiota und Pathogenen

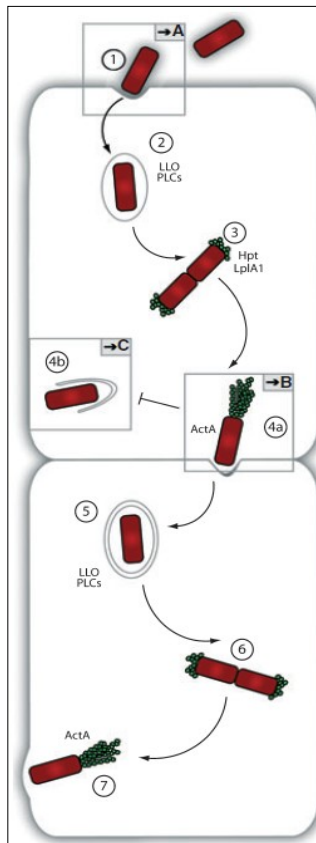
Bakterien sind ubiquitär vorhanden und zeigen eine hohe Variabilität in Bezug auf ihre Bedeutung für den Menschen. Mikroorganismen finden sich an Körperoberflächen wie Haut, Schleimhäuten, Mund, Urogenitaltrakt, Reproduktionsorganen und insbesondere im Darm (Madigan & Martinko, 2009). Die komplexe Zusammensetzung der individuell sehr unterschiedlichen Darmmikrobiota mit einer kalkulierten Gesamtzellzahl von ca. 10^{14} , die die Zahl der menschlichen Zellen um den Faktor 10 übersteigt, ist genetisch bedingt und wird von Interaktionen mit der Umwelt, der Ernährung, der Körperzusammensetzung, dem Nervensystem, Antibiotikagaben und weiteren Faktoren beeinflusst (Lyte, 2010; Guarner & Malagelada, 2003; Arumugam et al., 2011; Vrieze et al., 2010). Die zum größten Teil anaeroben Bakterienpopulationen variieren aufgrund divergierender Bedingungen in jedem Abschnitt des menschlichen Gastrointestinaltraktes (GIT). Der pH-Wert und die Anzahl an Bakterien, angegeben als *colony forming units* (cfu), steigen vom Magen zum Kolon an (Magen/Duodenum 10^3 cfu/ml; Jejunum/Ileum 10^4 - 10^8 cfu/ml; Kolon 10^9 - 10^{12} cfu/ml) (Blaut & Clavel, 2007; Sekirov et al., 2010). Die Darmmikrobiota erfüllt eine Vielzahl essentieller, metabolischer Aufgaben, wie die Synthese von lebenswichtigen Vitaminen (B_{12} , K), die vom menschlichen Körper selbst nicht hergestellt werden können. Die Eindickung verdauter Nahrung, Gasproduktion durch fermentierende Bakterien bei der Zersetzung von Nahrungsmitteln und Immunmodulation sind ebenfalls Prozesse, die von Darmbakterien unterstützt werden (Dethlefsen et al., 2007; Madigan & Martinko, 2009; Guarner & Malagelada, 2003). Neben den nützlichen Mikroorganismen schädigen jedoch krankheitsverursachende Bakterien den Menschen. Diese verfügen über verschiedene Pathogenitätseigenschaften wie speziellen Anheftungsstrukturen, Wachstumsfaktoren, invasiven Enzymen und hochwirksamen Toxinen (Madigan & Martinko, 2009). Im Folgenden werden die für die vorliegende Arbeit verwendeten, pathogenen Bakterienspezies *L. monocytogenes* und *E. coli*, die Nahrungsmittelinfektionen verursachen können, näher charakterisiert.

Listeria monocytogenes

Die Gattung *Listeria* umfasst stäbchenförmige, Gram-positive, nichtsporenbildende, kapsellose Bakterien, die mit den *Lactobacillus*-Arten verwandt sind und Katalase bilden. Von den beschriebenen *Listeria*-Arten ist die Spezies *L. monocytogenes* für den Menschen am bedeutsamsten, da dieses intrazelluläre Pathogen die durch kontaminierte Lebensmittel verursachte gastrointestinale Nahrungsmittelinfektion Listeriose verursachen kann. *Listeria ivanovii* ist insbesondere für Infektionen bei

Wiederkäuern und anderen Tieren verantwortlich, während die anderen *Listeria*-Arten als apathogen charakterisiert werden (Hain et al., 2006; Madigan & Martinko, 2009; Hain et al., 2012; Leclercq et al., 2010; Graves et al., 2010). *L. monocytogenes* wurde 1926 in England von Everitt George Dunne Murray et al. isoliert, dessen Initialen Stämme von *L. monocytogenes* bezeichnen, z.B. *L. monocytogenes* EGD-e (Murray et al., 1926). Hervorzuheben ist die Toleranz gegenüber einem breiten Temperaturspektrum (0-45 °C, motil bei Temperaturen zwischen 10-25 °C), wodurch sich *L. monocytogenes* im Kühlschrank vermehren kann. Die Bakterien sind säure- (pH Wert: 4,5) und salztolerant (10 % Natriumchlorid) (Mraheil et al., 2011; Vázquez-Boland et al., 2001). Die Übertragung von *L. monocytogenes* erfolgt über den Konsum kontaminierter, am häufigsten durch kalte, verzehrfertige Lebensmittel, wie Rohmilchprodukte, geräucherten Fisch, Salat oder bestimmte Weichkäsesorten aus pasteurisierter Milch. Das Auftreten einer Listeriose war in Deutschland mit einer durchschnittlichen jährlichen Inzidenz von 0,4 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner in den Jahren 2001 bis 2009 gering. Bei gesunden Menschen verläuft eine Infektion mit *L. monocytogenes* meist asymptomatisch oder mit milden gastrointestinalen Symptomen und eine invasive Erkrankung ist selten. Aber aufgrund der hohen Letalität von 10 % (weltweite Letalität von 30 %) (Stavru et al., 2011) mit invasiven Verläufen bei Risikogruppen wie Kleinkindern, Schwangeren, älteren und immunsupprimierten Personen gilt die Listeriose als eine gefährliche, meldepflichtige Infektionskrankheit (Robert-Koch-Institut, RKI, 2013). Klinische Symptome einer Listeriose sind u.a. Gastroenteritis, Meningitis, Meningoenzephalitis, Fieber, Sepsis, Früh- und Fehlgeburten, Abort und intrauterine oder perinatale Infektionen des Fötus (Vázquez-Boland et al., 2001). Aufgrund der Fähigkeit von *L. monocytogenes* in phagozytierenden und nicht-phagozytierenden Zellen einzudringen, breitet sich das Pathogen von der primär infizierten Zelle auf benachbarte Zellen aus und entkommt der humoralen Immunantwort (Hain et al., 2012). Ein enormes Arsenal von Virulenzfaktoren ist bei *L. monocytogenes* charakterisiert, die Wirtsproteinen ähneln, wodurch der Krankheitserreger die natürlichen zellulären Prozesse nutzen kann. Die Hauptvirulenzdeterminanten sind auf einer ~9 kbp chromosomalen Region lokalisiert, die *Listeria pathogenicity island 1 (LIPI-1)* genannt wird. Dieser auch als *prfA virulence cluster* bezeichnete chromosomale Bereich ist für den intrazellulären Lebenszyklus des Bakteriums verantwortlich (Mraheil et al., 2011; den Bakker et al., 2010; Hain et al., 2006). Spezifische Funktionen, die auf diesem Cluster lokalisiert sind, umfassen Listeriolysin O (LLO), *plcA*, *plcB*, *mpl* und *actA*. Aufgrund der PrfA-abhängigen Thermoregulation wird die Transkription der aufgeführten Virulenzgene bei 37 °C maximal induziert, wenn sich das Pathogen in der Wirtszelle befindet (Johansson et al.,

2002; Dussurget et al., 2004). Das Eindringen in nicht-phagozytierende Zellen wird durch zwei bakterielle Oberflächenproteine InlA und InlB gefördert, die zur Familie der Leucin-reichen Internaline gehören und an Oberflächenproteine der Wirtszellen binden. Während das InlA mit einem LPXTG-Motiv kovalent an das Peptidoglykan und das Adhärenzprotein E-Cadherin, einem transmembranen als Rezeptor fungierendem Glykoprotein, bindet, interagiert InlB nicht-kovalent mit den Lipoteichonsäuren und zielt



auf die Rezeptor-Tyrosin-Kinase Met. Aus der Bindung der beiden Internaline an ihre Rezeptoren resultieren die Rezeptorubiquitinierung, Rekrutierung von Clathrin, Neuordnung des kortikalen Zytoskeletts und letztlich die zelluläre Aufnahme des Pathogens (Dussurget et al., 2004; Stavru et al., 2011) (Abb. 1).

Abb. 1: Schematische Darstellung der Invasion und des intrazellulären Lebenszyklus von *L. monocytogenes* (modifiziert nach Stavru et al., 2011)

Nach Anheften und Aufnahme von *L. monocytogenes* in die Wirtszelle (1), wird durch das porenbildende, cholesterolabhängige Toxin Listeriolysin O (LLO) und die Phosphatidylinositolphospholipase A (*plcA*) die primäre Vakuole durch Destabilisierung der Membran zerstört (2) und das Pathogen in das Zytosol freigesetzt. Im Zytosol adaptiert es seinen Metabolismus durch die Expression verschiedener Gene wie den Hexosetransporter (Hpt), der durch Zuckeraufnahme für das intrazelluläre Wachstum essentiell ist oder die Lipoatproteinligase (LplA1) (3). Mithilfe des Aktinfilament-akkumulierenden Faktors *actA*, der für das in der Zytoplasmamembran verankerte Oberflächenprotein ActA kodiert, wird nach bakterieller Zellteilung ein polarisierter Aktin-Schwanz gebildet. Dadurch wird die intrazelluläre Motilität von *L. monocytogenes* ermöglicht (4a). Aufgrund der polarisierten Expression von *ActA* entgeht das Pathogen der Erkennung und Autophagiemaschinerie der Wirtszelle (4b). Durch Protuberanz dringt *L. monocytogenes* nicht-lytisch in die Nachbarzelle ein und nach der Invasion findet sich das Pathogen in einer sekundären Vakuole mit Doppelmembran (5), aus der es mithilfe von LLO und der durch Metallprotease (*mpl*) aktivierten Phospholipase B (*plcB*) entweichen kann. Das frei im Zytoplasma befindliche Bakterium beginnt einen neuen Infektionszyklus (6,7) (Mraheil et al., 2011; Stavru et al., 2011).

Escherichia coli

E. coli gehören zur Familie der *Enterobacteriaceae* und leben als Kommensalen natürlicherweise im Darm von Tieren und Menschen. Die Gram-negativen, stäbchenförmigen Bakterien sind peritrich begeißelt und Laktose-positiv (Madigan & Martinko, 2009). Kommensale Stämme von *E. coli* verursachen selten Krankheiten, allerdings existieren pathogene Stämme von *E. coli* mit speziellen Virulenzeigenschaften, die potenziell nahrungsmittelgestützte Krankheitserreger sein können. Bei pathogenen *E. coli* werden verschiedene Pathovaren unterschieden: enteropathogene *E. coli* (EPEC, verursachen Säuglingsdiarrhö), enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC, führen zur hämorrhagischen Kolitis und hämolytisch-urämischem Syndrom, HUS), enterotoxische *E. coli* (ETEC, verursachen massiv wässrige Durchfälle durch das hitzelabile Enterotoxin LT), enteroaggregative *E. coli* (EAEC, verfügen über spezielle Anheftungsstrukturen und besiedeln die Darmepithelzellen in

mehrlagigen Schichten), enteroinvasive *E. coli* (EIEC, penetrieren in die Schleimhaut des Kolons und können intrazellulär persistieren mit der Folge geschwüriger Inflammationen; enge Verwandtschaft mit *Shigella* ssp.), diffus adhärente *E. coli* (DAEC) und extraintestinale, uropathogene *E. coli* (UPEC, verursachen Harnwegsinfektionen, HWI) und weitere Kategorien (Fischer, 2014; Kaper et al., 2004). Insbesondere bei akuten HWI beruht die Ursache in 70-80 % der Fälle, bei chronischen in 30-40 % der Fälle auf einer Infektion durch *E. coli*. Andere durch *E. coli* beschriebene klinische Manifestationen sind u.a. Wundinfektionen, Sepsis, Appendizitis, Peritonitis und Meningitis von Früh- und Neugeborenen (Kayser et al., 2010).

Ein bedeutsames Beispiel für eine durch pathogene Stämme von *E. coli* verursachte Lebensmittelinfektion stellt die Epidemie vom Mai 2011 in Deutschland dar. Klinische Symptome waren eine erhöhte Inzidenz des HUS und nicht-blutige oder blutige Diarrhö (Mayer et al., 2012). Diese wurden mit dem multiresistenten, biofilmbildenden, säureunempfindlichen, enteroaggregativen, Shiga-Toxin (STX)-2-produzierenden (nicht STX-1) *E. coli* (EaggSTEC) (EAHEC O104:H4, Multilocus-Sequenztyp ST678) in Verbindung gebracht, der ebenso Shiga-Toxin-produzierender, enteroaggregativer *E. coli* (STEAEC) genannt wird (Clements et al., 2012). Klinisch bedeutsam ist die neuartige genetische Kombination aus Eigenschaften des enterohämorrhagischen (EHEC) und des enteroaggregativen *E. coli* (EAEC), der fest wie geschichtete Ziegelsteine in mehreren übereinanderliegenden Lagen („*stacked-brick adherence*“) an die Epithelzellen der Darmwand adhäriert (Mellmann et al., 2011; Brzuszkiewicz et al., 2011; Muniesa et al., 2012). In der folgenden Arbeit wird dieser Stamm der Epidemie 2011 als enteroaggregativer-hämorrhagischer *E. coli* (EAHEC) bezeichnet (Brzuszkiewicz et al., 2011; Frank et al., 2011; Mellmann et al., 2011; Mellmann et al., 2008; Hauser et al., 2013; Rasko et al., 2011; Abb. 2).

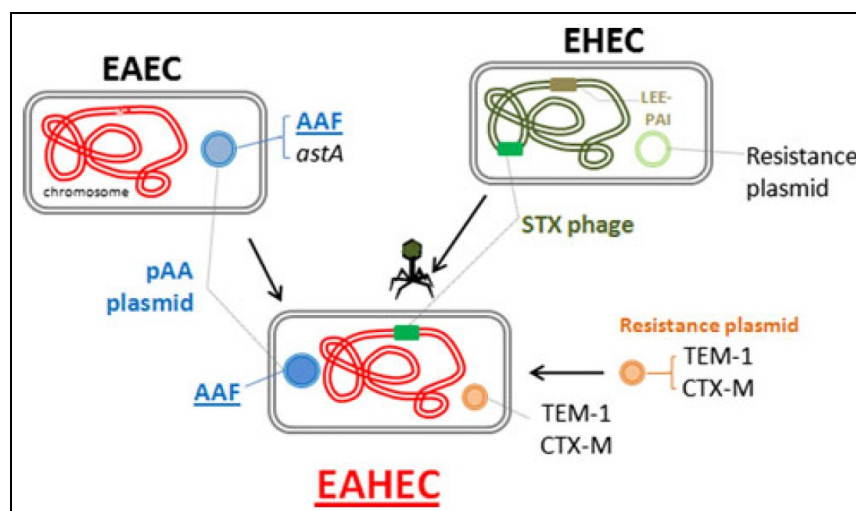


Abb. 2: Ursprung des neuartigen *E. coli*-Pathotyps EAHEC (Brzuszkiewicz et al., 2011)

HUS ist eine schwerwiegende und in manchen Fällen tödliche Komplikation, die durch akutes Nierenversagen, hämolytische Anämie und Thrombozytopenie (150.000 oder weniger Zellen/ mm^3) charakterisiert ist. Der Klon EAHEC41 (EAHEC O104:H4) ist seit 2001 bekannt (RKI, 2011; Künne et al., 2012; Cheung et al., 2011). Bei EAHEC werden als weitere mobile Elemente neben dem Bakteriophagen (STX-2) Plasmide beschrieben, die u.a. für Antibiotikaresistenz-vermittelnde Extended-Spektrum- β -Laktamasen (ESBL) vom Typ TEM-1 und CTX-M-15 kodieren (Bielaszewska et al., 2011; EFSA, 2011; Brzuszkiewicz et al., 2011; Abb. 2). Bei einer Infektion mit EAHEC erfolgte die Therapie mit Carbapenemen und Rifampicin zum Abtöten der Bakterien und Verminderung der STX2-Freisetzung (Muniesa et al., 2012), allerdings sind die Therapieoptionen aufgrund der Multiresistenz bei diesem hochpathogenen Krankheitserreger stark eingeschränkt.

Im Ausbruchszeitraum 2011 wurden in Deutschland 855 HUS-Fälle (davon 35 Todesfälle) und 2.987 Fälle akuter Gastroenteritis (davon 18 Todesfälle) festgestellt, wobei sich überwiegend Frauen mit einer gesunden Ernährung, seltener Kinder und Männer mit EAHEC infizierten (Anhang A1) (Konsiliarlabor für hämolytisch-urämisches Syndrom, KL HUS, 2011; RKI, 2011; Muniesa et al., 2012). Dies ist im Hinblick auf die vorliegenden Untersuchungen mit den Beerenextrakten ernährungsphysiologisch interessant. Die Epidemiologie 2011 war für HUS untypisch, wie der Vergleich mit den Jahren 2006-2010 zeigt, in denen nur 1,5-10 % der erwachsenen Personen erkrankt und beide Geschlechter gleichermaßen betroffen waren (Frank et al., 2011). Vermutlich handelt es sich beim EAHEC (2011) um ein ausschließlich humanes Pathogen. EAHEC überlebt nach Freisetzung in die Umwelt auf Lebensmitteln, Pflanzen oder in Gewässern, möglicherweise in einem *viable-but-not-culturable* (VBNC)-Zustand (Aurass et al., 2011). Dieser charakterisiert Bakterien in einem Stadium mit geringer metabolischer Aktivität, die ihre Vermehrung zwar eingestellt haben, aber noch lebensfähig sind. Bakterien ziehen sich in diesen Zustand als Reaktion auf Stress, nicht adäquatem Nährstoffangebot, ungünstige Temperatur-, Sauerstoff- oder Lichtbedingungen zurück. Im VBNC-Stadium sind die Bakterien morphologisch kleiner, weisen eine verminderte Nährstofftransport-, Respirationsrate und Synthese von Makromolekülen auf. Der VBNC-Zustand kann als eine von Bakterien entwickelte Überlebensstrategie angesehen werden, die es ermöglicht, Antibiotikaresistenzen, Informationen zur Produktion von Virulenz- und Pathogenitätsfaktoren zu konservieren und jahrelang in der Umwelt zu persistieren (Oliver, 2005).

1.2 Bedeutung von reaktiven Sauerstoffspezies bei der Antibiotikatherapie

1.2.1 Bildung und Wirkungen von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

Sauerstoff (O_2), ein lebenswichtiges chemisches Element, ist mit ca. 21 % in der Luft enthalten. Der durch die Photosynthese der Pflanzen entstandene O_2 wird bei der Atmung in den Organismus aufgenommen und dient der vollständigen Oxidation von Nährstoffen. O_2 kann jedoch innerhalb der Atmungskette zur Bildung von aggressiven Sauerstoffradikalen (*reactive oxygen species*) (ROS) führen (Löffler, 2008). Die wesentliche Quelle für ROS ist die Ein-Elektronenreduktion von molekularem O_2 zum reaktiven Superoxidanion ($O_2^{\bullet-}$). Dabei spielt die Geschwindigkeit des Elektronenflusses innerhalb der Elektronentransportkette, weniger die O_2 -Konzentration, eine Rolle. Wenn die Komplexe der Atmungskette reduziert werden, sind sie reaktiver gegenüber O_2 und durch das höhere Membranpotential können die Elektronen zurück zu Komplex I transportiert werden, was ROS induziert. Ohne Kompensation führt die Bildung von ROS zu einer Wachstumsinhibition bei geringerem Adenosintriphosphat (ATP)-Bedarf und stark reduzierten Atmungskettenkomplexen (Lane, 2011). Der Begriff „oxidativer Stress“ wurde im Jahre 1985 von Helmut Sies eingeführt und beschreibt das Ungleichgewicht zwischen gebildeten ROS (bzw. anderen toxischen Substanzen wie *reactive nitrogen species*) zu Ungunsten der antioxidativen Mechanismen (Sies, 1985). Solange der Organismus in der Lage ist, die entstehenden Radikale zu entgiften, wird oxidativer Stress verhindert. Die Aktivitäten von Entgiftungsenzymen wie Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase und Katalase vermindern eine Akkumulation von ROS (Imlay & Linn, 1986). Ebenso können nicht-enzymatische Antioxidantien und Chelatoren wie Glutathion, Thiourea, Dipyridyl, Ubichinon, Vitamin C und Vitamin E oder bioaktive sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe wie Anthocyane oxidativen Reaktionen entgegenwirken (Berg et al., 2012). Sowohl die Entstehung von ROS als auch die beschriebenen Entgiftungsmöglichkeiten hängen von zahlreichen Faktoren ab. Aus einem Ungleichgewicht zwischen Prooxidation und antioxidativen Prozessen resultierender oxidativer Stress führt zu einer Schädigung von Makromolekülen wie Zellproteinen, Lipiden, Kohlenhydraten und der Desoxyribonukleinsäure (DNA) (Abb. 3).

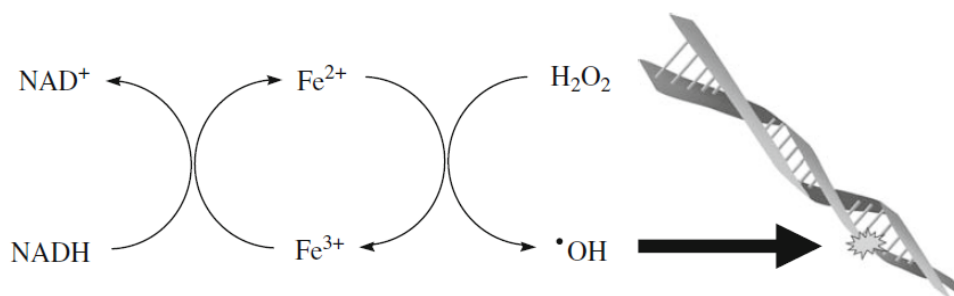
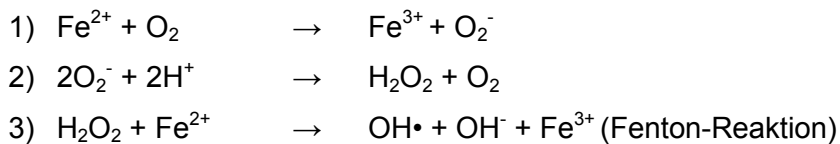


Abb. 3: Fenton-Reaktion durch Recycling von Fe^{3+} zu Fe^{2+} durch zelluläre Reduktionsmittel (NADH)
(Perron & Brumaghim, 2009)

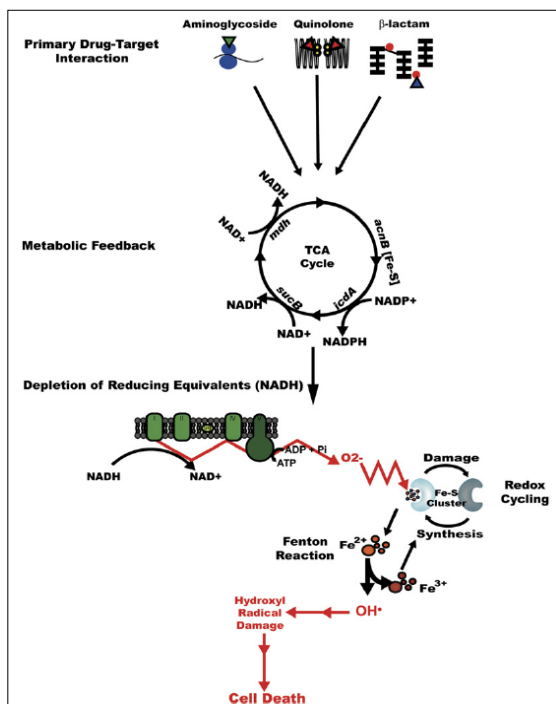
1.2.2 Einfluss von Eisen auf die Bildung von ROS

Eisenionen (Fe) sind für die meisten Organismen als Cofaktor für verschiedene Enzyme und innerhalb der Elektronentransportkette essentiell, aber unter aeroben Bedingungen aufgrund der geringen Löslichkeit des stabilen Oxidationszustandes als Fe^{3+} potenziell toxisch. Freies Fe ist in Kombination mit O_2 gefährlich für die Zellen, da es die Produktion von ROS durch folgende Reaktionen potenziert (Chiancone et al., 2004):



Über die Fenton-Reaktion wird das redoxaktive und diffusionsfähige zweiwertige Fe^{2+} mit dem im Verhältnis weniger gefährlichen Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zum hochreaktiven Hydroxylradikal (OH^\bullet) und stabilerem dreiwertigem Fe^{3+} in unmittelbarer Nähe der DNA oxidiert. Bereits 1894 fand H. J. H. Fenton heraus, dass Fe(II)sulfat und H_2O_2 die Oxidation von Weinsäure verursachen und sich nach Zugabe von Alkalisalz eine violette Farbe bildet. Später wurden diese chemisch extrem reaktionsfreudigen Substanzen als Hydroxylradikale identifiziert und deren Produktion nach dem Entdecker als Fenton-Reaktion bezeichnet (Fenton, 1894) (Abb. 3).

OH^\bullet kann einerseits das 4'-Wasserstoffatom des Desoxyribose-Zuckerrückgrates der DNA abspalten, woraus Strangbrüche der Desoxyribose resultieren. Andererseits können OH^\bullet die Nukleotidbasen schädigen, wobei oxidierte Basenprodukte wie 8-oxo-Guanin und fragmentierte ringoffene Derivate entstehen. DNA-Schäden beider Typen (Strangbrüche oder Basenschäden) enden letztlich in genetischen Mutationen mit



Fehlpaarungen und Auswirkungen auf die Genexpression (Perron & Brumaghim, 2009). Kohanski et al. postulieren, dass bakterizide Antibiotika über Induktion von oxidativem Stress wirken. Über den Citratzyklus und die Hyperaktivierung der Elektronentransportkette wird die Bildung von O_2^- stimuliert. Dies schädigt Fe-Schwefel-Komplexe, aus denen reduziertes Fe^{2+} für die Fenton-Reaktion freigesetzt wird (Kohanski et al., 2007) (Abb. 4).

Abb. 4: Modell für die Wirkmechanismen bakterizider Antibiotika
(Kohanski et al., 2007)

Andere Forscher zeigen jedoch, dass der bakterizide Effekt der Antibiotika nicht auf ROS zurückzuführen ist (Keren et al., 2013; Liu & Imlay, 2013), worauf in der Diskussion dieser Arbeit eingegangen wird.

Zur Erzeugung von oxidativem Stress wurde neben H_2O_2 in den Experimenten der vorliegenden Arbeit Paraquat, eine quartäre Ammoniumverbindung, verwendet. Paraquat wird über Multidrugtransporter in die Bakterienzelle transportiert und durch eine NAD(P)H-abhängige Paraquat (PQ^{2+})-Diaphorase zu einwertigem Paraquat reduziert. Bei Anwesenheit von O_2 wird dabei $\text{O}_2\cdot^-$ gebildet (Kao & Hassan, 1985).

1.2.3 Eisenaufnahme und -speicherung in *L. monocytogenes* und *E. coli*

Um die große Spannbreite zwischen Eisenangebot und Eisenbedarf zu regulieren, exprimieren Bakterien verschiedene Eisenakquisitionssysteme. Gram-negative Bakterien verfügen über Eisenaufnahmemechanismen wie Siderophore (griech. Eisenträger) (500-1.500 Da) mit einer hohen Affinität und Spezifität für Fe^{3+} -Ionen (Komplexbildungskoeffizient $K_f > 10^{30}$) und der Synthese von Transportsystemen, die Fe über spezifische Rezeptoren in die Zelle transportieren (Hider & Kong, 2010). Dabei werden verschiedene Typen unterschieden und die für die vorliegende Arbeit relevanten, wie Enterobaktin ($K_f > 10^{45}$) (Avdeef et al., 1978), Yersiniabaktin und Aerobaktin, gezeigt (Abb. 5). Nach der Biosynthese im Zytoplasma, der Siderophore-Sekretion, der Ferri-Siderophore-Rezeption und der Ferri-Siderophore-Internalisierung wird Fe letztlich ins Zytoplasma abgegeben (Garénaux et al., 2011; Miethke & Marahiel, 2007). Die Transkription der Fe-III-Dicitrat-Transportgene (*fecABCDE*) wird in *E. coli* nur initiiert, wenn Fe-III-Dicitrat an das äußere Membranprotein FecA bindet, wodurch eine Signalkaskade von der Zelloberfläche ins Zytoplasma resultiert.

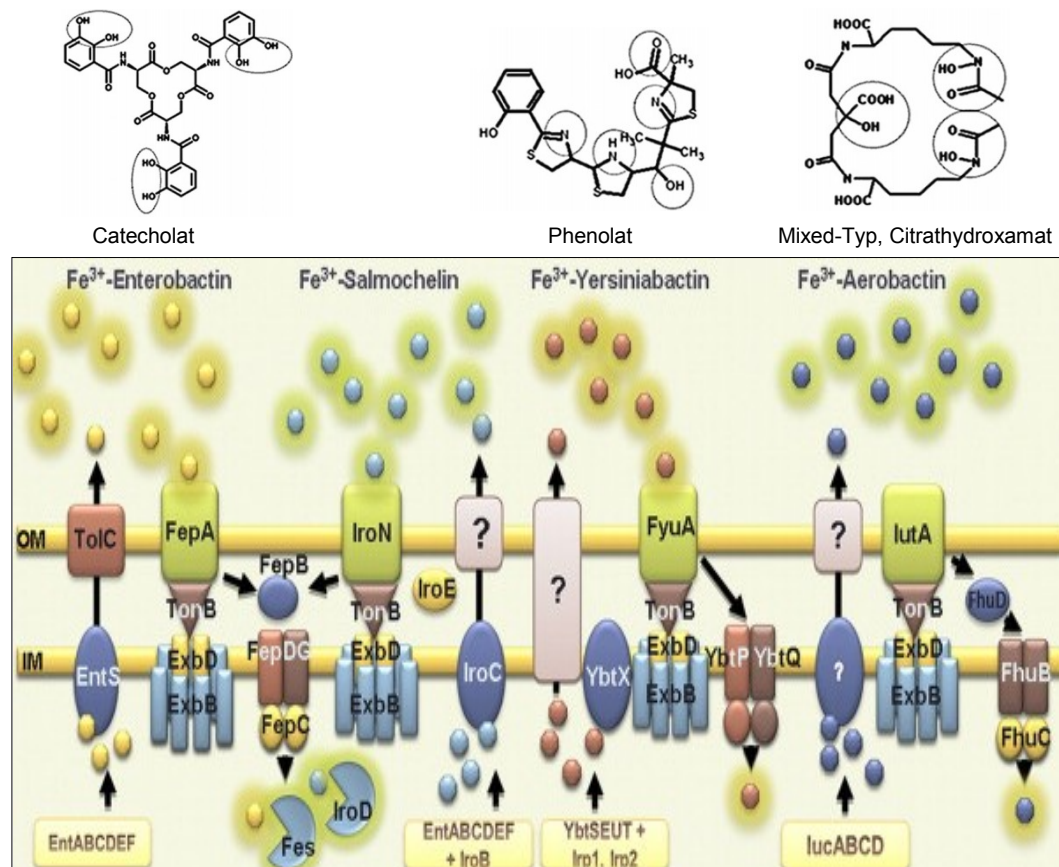


Abb. 5: Siderophore-abhängige Eisenaufnahmesysteme in *E. coli*

Synthese (gelbes Rechteck), Sekretion (dunkelblau), Rezeption (hellgrün), Internalisierung (braun) und Freisetzung des Eisens/Abbau der Siderophore (Garénaux et al., 2011)

Gram-positive Bakterien hingegen wie *L. monocytogenes* besitzen relativ wenige Mechanismen für die Eisenaufnahme. Spezifisch ist die Reduktion von Fe^{3+} durch eine Ferrireduktase, die auf der Bakterienoberfläche lokalisiert ist und den direkten Import von Fe^{2+} -Ionen ermöglicht (Chiancone et al., 2004). *L. monocytogenes* produziert keine Siderophore, sondern sekretiert einerseits ein Reduktionsmittel in Kombination mit der Präsenz einer Fe-II-Bindungsdomäne auf der Bakterienoberfläche oder nimmt die Metallionen über einen induzierbaren Fe-III-Citrat-Aufnahmemechanismus auf. Die Eisenaufnahme in *L. monocytogenes* lässt sich in zwei Prozesse separieren: Die Eisenakquisitionsphase mit Eisenmobilisierung aus der Umgebung und der Interaktion des Metalls auf der Bakterienoberfläche und eine zweite Phase, in der Fe durch die Zellwand und Zellmembran transportiert und in das Zytoplasma freigegeben wird (Coulanges et al., 1998; Adams et al., 1990; Simon et al., 1995).

Die Eisenakquisition wird unter Eisenmangelbedingungen stimuliert (Avdeef et al., 1978; Simon et al., 1995; Newton et al., 2010). Der hohen Reaktivität von Fe wirken die Bakterien durch Einlagerung von freiem Fe in Eisenspeicherproteinen wie Ferritin entgegen. Eine engmaschige Regulierung der Eisenhomöostase ist unabdingbar zur Erhaltung der Balance zwischen ausreichender Aufnahme und Verhinderung schädigender Wirkungen des Metalls (Chiancone et al., 2004).

1.3 Problematik der Antibiotikaresistenzen

Viele (pathogene) Bakterien entwickeln Resistenzen durch genetischen vertikalen/klonalen (innerhalb einer Spezies) und horizontalen (Gattungs- und Spezies-übergreifend) Informationsaustausch. Es resultiert eine enorme Variabilität an Eigenschaften durch Aufnahme/Verlust von chromosomal, Plasmid- und/oder Phagen-kodierten Virulenzfaktoren und Resistenzen, wodurch therapeutische Strategien unwirksam werden können (EFSA, 2011).

Als bekannteste Vertreter der MRE sind Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) zu nennen. Die Antibiotikatherapie bei einer schweren Infektion mit *S. aureus* erfolgt initial nicht mit einem einzelnen β -Laktam-Antibiotikum, sondern i.d.R. mit einer Kombinationstherapie, wie ein Cefalosporin+Clindamycin oder Vancomycin+Rifampicin (Stille et al., 2005). Allerdings bilden 80 % der Stämme β -Laktamasen. MRSA breitet sich weltweit aus, wobei die Resistenz auf einer Veränderung der Expression des Penicillinbindepoteins beruht (Otto, 2010; Groß, 2009). Dabei werden im Krankenhaus erworbene Infektionen (*hospital-associated*, HA-MRSA), außerhalb des klinischen Settings (*community-associated*, CA-MRSA) (Otto et al., 2013) und im landwirtschaftlichen Bereich auftretenden Resistenzen differenziert (*livestock-associated*, LA-MRSA) (van Meurs et al., 2013).

Weitere bekannte MRE sind die Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE), wobei Enterokokken allgemein eine intrinsische Resistenz gegenüber vielen Antibiotika aufweisen. VRE haben zusätzlich gegenüber den Glykopeptiden Vancomycin und Teicoplanin Resistenzen erworben (Paulsen et al., 2003; Kayser et al., 2010; Jett et al., 1994). Vancomycin in Kombination mit Aminoglykosiden stellt eine effiziente Alternative gegen schwere enterokokkale und andere Infektionen bei Patienten dar, die eine Medikation mit Antibiotika der Penicillin-Klassen nicht tolerieren. Ende der 1980er Jahre wurden Vancomycin-resistente Stämme von *E. faecalis* beschrieben, wobei insbesondere bei klinischen Isolaten von *E. faecium* und *E. faecalis* VRE auftreten (Sahm et al., 1989; Paulsen et al., 2003; Rathnayake et al., 2012). Vancomycin lagert sich an das endständige D-Alanyl-D-Alaninpeptid an und verhindert die Transpeptidase-Reaktion (Transglykosylierung), die die Quervernetzung des Mureins der bakteriellen Zellwand katalysiert. Die Vancomycinresistenz ist bedingt durch Expression einer alternativen D-Alanyl-D-Alanin-Ligase, die D-Lactat anstelle von D-Alanin ligiert, woraus ein (-OH)- statt eines (-NH₂)-Terminus auftritt. Dies verhindert die Bindung von Vancomycin und ermöglicht die Quervernetzung des Mureins. Isolate von Enterokokken mit einer geringeren Suszeptibilität gegenüber Vancomycin werden als *vanC* (intrinsisch), *vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE* und *vanG* (erworben) kategorisiert, wobei

die Phänotypen *vanA* und *vanB* am häufigsten auftreten (Foulquié Moreno et al., 2006; Murrar, 1998; Ogier & Serron, 2008; Freitas et al., 2013).

Der Einführung von Breitbandcephalosporinen in den 1970er Jahren folgte das Auftreten von klinisch resistenten Stämmen der *Enterobacteriaceae*-Familie, die sogenannte Extended-Spektrum- β -Laktamasen (ESBL) produzieren. Diese werden insbesondere von *E. coli* und *Klebsiella* spp. gebildet und hydrolysieren den β -Laktam-Ring von β -Laktam-Antibiotika, wodurch deren therapeutische Wirksamkeit verhindert wird (Wollheim et al., 2011). EAHEC (2011) ist ein Beispiel für sogenannte ESBL produzierende Bakterienstämme. ESBL zeigen eine erweiterte Substratspezifität der bereits existierenden β -Laktamasen durch einfache oder multiple Aminosäuren (AS)-Substitutionen in entscheidenden Positionen und eine Ausbreitung von neuen plasmidalen Elementen, die für Enzyme mit ESBL-Aktivität kodieren. Die Vielzahl an verschiedenen ESBL-Varianten werden in neun evolutionäre Familien, basierend auf dem AS-Sequenzvergleich, eingeteilt: TEM, SHV, PER, VEB, GES, TLA, BES, OXA und CTX-M. Typ CTX-M-ESBL ist dabei am weitesten verbreitet und nach der erhöhten hydrolytischen Aktivität gegenüber Cefotaxim (CTX) im Vergleich zu Ceftazidim und dem Platz der Isolation in München (M) benannt (Naseer & Sundsfjord, 2011; Livermore et al., 2007; Mshana et al., 2009).

Problematisch ist die weltweite Verbreitung von Carbapenemasen, die zusätzlich Reserveantibiotika wie Meropenem, Doripenem und Tebipenem unwirksam machen. Carbapenemase (z.B. *New Delhi metallo-beta-lactamase 1*, NDM-1)-produzierende *Enterobacteriaceae* sind nicht nur für hospitalisierte Patienten gefährlich, da die Therapieoptionen extrem eingeschränkt sind (Tzouveleakis et al., 2012; Kumarasamy et al., 2010). Neuere Klassifikationen charakterisieren multiresistente, Gram-negative Stäbchen (MRGN) nicht aufgrund von Resistenzmechanismen, sondern anhand ihrer Resistenzen gegenüber den vier verschiedenen Antibiotikagruppen Acylureidopenicillinen (Leitsubstanz: Piperacillin), 3./4. Generations-Cephalosporinen (Leitsubstanzen: Cefotaxim, Ceftazidim), Carbapenemen (Leitsubstanzen: Imipenem, Meropenem) und Fluorochinolonen (Leitsubstanz: Ciprofloxacin). Dabei sind 3MRGN bzw. 4MRGN gegen 3 bzw. 4 der Antibiotikagruppen resistent (RKI, 2012), was Patienten mit solchen Erregern isolierungspflichtig macht.

1.4 Potenziell antiinfektive Substanzen gegen multiresistente

Krankheitserreger

Die Forschung an multiresistenten Krankheitserregern wie EAHEC ist von enormer Relevanz. Im Rahmen von nosokomialen Infektionen ist eine besorgniserregende, unkontrollierbare und kostenverursachende Ausbreitung von sogenannten

multiresistenten Erregern (MRE) mit neuartigen Resistenzprofilen zu verzeichnen. Diese wird durch die weltweite Zunahme des Antibiotika-Verbrauches begünstigt. Allerdings sind für die Therapie der (multi)-resistenten Bakterien keine nennenswerten, neuartigen Antibiotika in der Entwicklung. Daher ist die Suche nach Alternativen zu den herkömmlichen Antibiotika von großer Bedeutung. Naturstoffe aus der Flora (sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe wie Anthocyane aus Beerenextrakten) und Fauna (Insekten-spezifische Substanzen wie antimikrobielle Peptide) bieten eine enorme Vielfalt an potenziell antiinfektiven Substanzen, deren Wirkungen in dieser Arbeit untersucht werden.

1.4.1 Anthocyane aus Pflanzenextrakten

Neben Makronährstoffen (Kohlenhydrate, Proteine, und Lipide) werden Mikronährstoffe wie Vitamine, Mineralstoffe, Spurenelemente und sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe oral aufgenommen. Mehr als 200.000 Strukturen dieser chemisch sehr heterogenen Sekundärmetabolite werden beschrieben. Darunter befinden sich die in der Flora weit verbreiteten Anthocyane mit über 625 identifizierten Vertretern (He & Giusti, 2010), die eine Untergruppe der Flavonoide (ca. 10.000 bekannte Flavonoide) bilden (Tahara, 2007). Der frühevolutionäre Einsatz von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen in der Pharmakologie zeigt ihre Relevanz für den humanen Organismus und erklärt die vielseitigen Forschungsaktivitäten (Bresinsky, 2008).

1.4.1.1 Herkunft (Traube, Holunder, Heidelbeere)

Das im Rahmen dieser Dissertation verwendete Anthocyan-haltige Untersuchungsmaterial stammt von den beiden Weintraubensorten *Dakapo* und *Accent*, von Heidel- und Holunderbeeren. Im Folgenden werden diese Nutzpflanzen beschrieben, wobei insbesondere auf die Weinrebe eingegangen wird (Tab. 1), da das Traubenextrakt *Dakapo* für die Transkriptomanalysen verwendet wurde.

Tab. 1: Taxonomie der Kultur-Weinrebe

Abteilung	Bedecktsamer (<i>Magnoliophyta</i>)
Klasse	Dreifurchenpollen-Zweikeimblättrige (<i>Rosopsida</i>)
Unterklasse	Rosenähnliche (<i>Rosidae</i>)
Ordnung	Weinrebenartige (<i>Vitales</i>)
Familie	Weinrebengewächse (<i>Vitaceae</i>)
Gattung	Weinrebe (<i>Vitis</i>)
Art	Weinrebe (<i>Vitis vinifera</i> L.)

Die Weinrebe findet sich besonders im Mittelgebirge. Diese wirtschaftlich bedeutendsten heimischen Beeren werden zu Wein, Sekt, hochprozentigen alkoholischen Getränken und anderen Produkten verarbeitet und konsumiert (Haeupler

& Muer, 2007; Lieberei et al., 2007). Die Testsubstanz *Dakapo* ist eine Kreuzung der Traubensorten *Deckrot* und *Blauer Portugieser*. Die Deckrotweinsorte *Dakapo* kennzeichnen eine dunkelrote Farbe, weiche Säure und ein neutraler Geschmack (Dietrich et al., 2009).

Heidelbeeren (auch Blaubeeren genannt) werden zum Beerenobst der gemäßigten Breiten gezählt. Die bereiften Heidelbeeren haben aufgrund eines hohen Gehaltes an antioxidativ wirksamen Anthocyanen eine blau-schwarze Farbe und pharmakologische Wirkungen. In ähnlichen Verbreitungsgebieten wie die Heidelbeere sind Holunderbeeren zu finden. Die im Herbst reifen Früchte dieser dem Wildsteinobst zugeordneten Heilpflanze mit ethnobotanischer Bedeutung sind schwarz und werden für Suppen, Soßen, Saft, Fruchtwein oder Likör verwendet. Allerdings kann bei einer unprofessionellen Handhabung das cyanogene Glykosid Sambunigrin im Saft enthalten sein, aus dem Blausäure freigesetzt wird (Haeupler & Muer, 2007; Lieberei et al., 2007).

1.4.1.2 Einteilung, Struktur und Aufbau

Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe zeigen sehr heterogene chemische Strukturen. Zu diesen Sekundärmetaboliten gehören u.a. Polyphenole, die sich weiter in Phenolcarbonsäuren (z.B. hydroxylierte Derivate der Benzoe- und Zimtsäure), Stilbene (z.B. Resveratrol), Lignane (z.B. Pinoresinol) und Flavonoide unterteilen lassen. Zu den Flavonoiden zählen neben den im Rahmen dieser Dissertation näher betrachteten Anthocyanidinen u.a. die Flavonole, Flavan-3-ole, Flavone, Flavanone und Dihydrochalkone. Das C₆-C₃-C₆-Grundgerüst bildet bei diesen Flavonoidunterklassen ein Flavan (2-Phenylbenzodihydropyran) aus zwei aromatischen Ringen A und B und einem heterozyklischen C-Ring. Dieser weist je nach Unterklasse unterschiedliche Sättigungs- und Oxidationsgrade der Kohlenstoffatome auf (Abb. 6A,B) (Bayer, 1996).

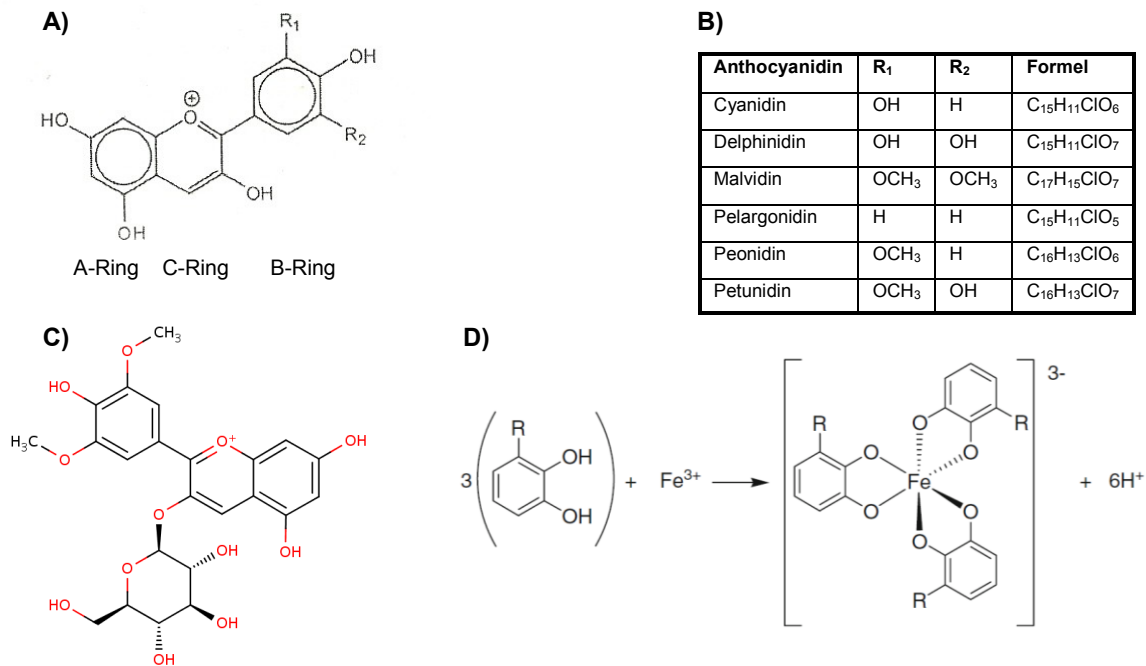


Abb. 6: Anthocyanidin-Grundgerüst; Substitutionsmuster; Malvidin-3-O-Glukosid; Eisenkomplexbildung

A: Grundgerüst der Anthocyanidine (Dietrich et al., 2009). **B:** Substitutionsmuster der wichtigsten Anthocyanidine (He & Giusti, 2010; EFSA, 2013). **C:** Malvidin-3-O-Glukosid (Neveu et al., 2010). **D:** Octahedrale Koordinationsgeometrie von Fe-Polyphenol-Komplexen, R=H bei Catechol (Perron & Brumaghim, 2009).

Als Anthocyanidine (englisch *anthocyanidins*) werden die Aglykone der Anthocyane (englisch *anthocyanins*) bezeichnet. Der Name Anthocyan leitet sich von *anthos* (griech. Blüte) und *kyanos* (griech. blaue Farbe) ab (He & Giusti, 2010). Bei sehr niedrigen pH-Werten (<2) ist das Sauerstoffatom im C-Ring der Anthocyane positiv geladen und liegt als stark rot gefärbtes Flavylumkation (2-Phenylbenzopyrylium) vor, was einzigartig für diese Flavonoidunterklasse ist (Mas et al., 2000). In wässriger Lösung bei pH-Wert 3-6 führt die Hydratation des Flavylumkations an der C₂-Position zur Bildung einer farblosen Carbinol-Pseudobase. Die Carbinolform kann bei pH-Wert 6-7 in eine purpurfarbene chinoide Anhydrobase übergehen und bei weiterem pH-Wert-Anstieg bildet sich eine tiefblaue, ionische Anhydrobase, die durch Ringöffnung zu einer farblosen Chalkon-Pseudobase transformiert wird, wobei höhere Temperaturen diese Umwandlung fördern (Lapidot et al., 1999; Fleschhut, 2004).

Die Vielfalt der Pflanzenfarbstoffe resultiert aus den Substitutionsmustern des B-Rings kombiniert mit verschiedensten Glykosilierungen des A- und C-Ringes. Der Zuckerrest ist bei einigen Anthocyane u.a. mit Essig-, Zimt-, Malon-, Oxalsäure, Cumar-, Kaffee- oder Gallussäure acyliert (Song et al., 2013; Reiersen et al., 2003). Die Anthocyanidine Cyanidin, Delphinidin, Malvidin, Pelargonidin, Peonidin und Petunidin sind in der Natur am weitesten verbreitet. Sie bilden durch einfache oder mehrfache Glykosylierung v.a. mit den Monosacchariden Glukose, Rhamnose, Arabinose, Galaktose, Xylose und den Disacchariden Rutinose und Sambubiose ca. 95 % aller Anthocyan-Unterklassen (Abb. 6C) (He & Giusti, 2010; Dietrich et al., 2009; Wu et al., 2006). Anthocyanidine

absorbieren sichtbares Licht, wobei die Farbe von tiefrot bis -blau je nach Grad der Hydroxylierung (Blauverschiebung), Glykosylierung und Methylierung (Rotverschiebung) variiert. Diese nehmen ebenso Einfluss auf die Stabilität der Verbindungen wie die Temperatur, Lichtintensität, Proteine, Metallionen und insbesondere der pH-Wert. In saurer Umgebung sind die Anthocyane stabiler, ein neutrales und alkalisches Milieu fördert den Zerfall (Zhang et al., 2005; He & Giusti, 2010; Andersen & Markham, 2006). Glukosidasen hydrolysieren die glykosidischen Bindungen in Anthocyanen, wodurch instabilere, Zucker-freie, braune oder farblose Anthocyanidine entstehen (Song et al., 2013; Manzanares et al., 2000). Diese Aglykone haben einen größeren biologischen Effekt als die Glykoside, so dass die Deglykosylierung wichtig für die Wirkung der Anthocyane ist (Day et al., 1998). Nach Öffnung der Ringstruktur werden aus dem resultierenden Diketon als intermediäre Metabolite Aldehyde und eine charakteristische Phenolcarbonsäure gebildet. Das Aldehyd ist für alle Aglykone identisch. Als Phenolcarbonsäure entstehen z.B. aus Cyanidin → Protocatechusäure, aus Malvidin → Syringasäure, aus Peonidin → Vanillinsäure und aus Pelargonidin → 4-Hydroxybenzoesäure (Fleschhut, 2004; Seeram et al., 2001). Einige Anthocyane können Fe und andere Metalle chelatieren (Abb. 6D). Für die komplexierende Wirkung ist eine Catecholstruktur verantwortlich, wie sie in den Anthocyanen Delphinidin (mit Pyrogallolhälfte im Flavylium-B-Ring), Cyanidin oder Petunidin (jeweils mit Catechol substituiertem B-Ring) auftritt und beim Abbau dieser Anthocyane entsteht (van Acker et al., 1996). Die Anthocyane haben unterschiedliche antioxidative Kapazitäten (Delphinidin > Cyanidin > Peonidin > Malvidin), wobei nur Delphinidin, Petunidin und Cyanidin aufgrund der Ortho-dihydroxystruktur antioxidativ wirksam und effizient im Radikal-Scavenging sind (Cooke et al., 2005; Rice-Evans et al., 1996; Buchweitz et al., 2012; Bayer, 1966).

1.4.1.3 Funktionen in Pflanzen

Die bioaktiven Substanzen sind in der Pflanze quantitativ unbedeutend, nehmen aber wichtige Funktionen ein. Eine der Hauptaufgaben der Anthocyane ist ihre antioxidative Wirkung und daraus resultierende Protektion der Pflanze vor oxidativem Stress durch das Abfangen freier Radikale. Anthocyane sind in der Lage die DNA zu stabilisieren, wobei durch die Komplexbildung oxidative Schäden, sowohl von der DNA als auch von den Anthocyanen abgehalten werden (Abb. 7).

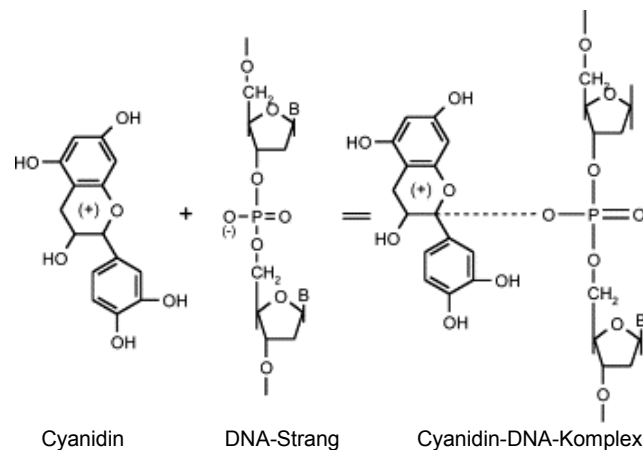


Abb. 7: Mechanismus für die Cyanidin-DNA-Interaktion
(modifiziert nach Kong et al., 2003)

Ebenso schützen Anthocyane die Pflanze vor ultraviolettem Licht. Hervorzuheben ist die ökochemische Funktion der farbindensiven Anthocyane als Lock- und Schreckstoffe. Anthocyane stellen einen quantitativ bedeutsamen Schutz gegenüber Pflanzenfressern (Herbivoren) und vielen mikrobiellen Pathogenen (Viren, Bakterien, Pilze) dar und sind an der Fortpflanzung durch Anlocken von Pollen-sammelnden und Fruchtbestände-bestäubenden Insekten beteiligt (Mas et al., 2000; Kong et al., 2003). Die Biosynthese der Anthocyane findet im Zytoplasma mit Beteiligung des endoplasmatischen Retikulums statt. Die Flavonoid-Endprodukte werden zu verschiedenen subzellulären oder extrazellulären Lokalisationen transportiert und ihre Lagerung erfolgt in den Vakuolen (Andersen & Markham, 2006; Bresinsky et al., 2008).

1.4.1.4 Aufnahme, Metabolismus und ernährungsphysiologische Relevanz

Die individuell sehr unterschiedliche alimentäre Zufuhr an sekundären Pflanzeninhaltsstoffen wird in Deutschland für eine gemischte Kost auf ca. 1,5 g geschätzt (Watzl & Leitzmann, 2005). Dabei zählt die täglich aufgenommene Menge an Anthocyanen mit durchschnittlich ca. 2,7 mg zur höchsten unter den Flavonoiden, unterliegt jedoch starken individuellen Schwankungen in Abhängigkeit von z.B. Ernährungspräferenzen, finanziellen, kulturellen, regionalen und saisonalen Bedingungen (Schwankungsbreite 0-76 mg/Tag, Watzl et al., 2002; 12,5 mg/Tag/Person in den USA, Wu et al., 2006; bis zu 200 mg/Tag, McDougall et al., 2007). Selbst moderater Rotweinkonsum (Richtwert für eine akzeptable Alkoholmenge: 10 g/Tag für gesunde Frauen und 20 g/Tag für gesunde Männer, entspricht ca. 250 ml Wein/Tag, Deutsche Gesellschaft für Ernährung, DGE, 2013) erhöht die Anthocyanzufuhr enorm (100 ml enthalten ca. 24-35 mg Anthocyane), ebenso wie ein saisonal bedingter erhöhter Verzehr Anthocyan-haltiger Früchte (z.B. Holunder, Kirschen, Trauben, Heidel-, Apfel-, Preisel-, Johannis- und Himbeeren) und Gemüse (z.B. Bohnen, Auberginen, Rotkohl) (Wu et al., 2006; Neveu et al., 2010). Im

Lebensmittelbereich werden Anthocyane als Farbstoffe verwendet und als E 163 bezeichnet (Bundesministerium für Gesundheit, 2013; EFSA, 2013). Ebenso werden Anthocyane als Nahrungsergänzungsmittel verkauft sowie in der pharmazeutischen und kosmetischen Industrie verarbeitet (Dietrich et al., 2009).

Allgemein ist eine sehr geringe Bioverfügbarkeit der Anthocyane zu verzeichnen (Watzl et al., 2002), wobei die Anthocyan-Konzentrationen nach Konsum von entsprechenden Nahrungsmitteln im Dickdarm schwierig abzuschätzen sind und in Abhängigkeit von der Aufnahmemenge und -art stark variieren können (McGhie & Walton, 2007). Die Absorption beginnt bereits im Magen, im Dünndarm findet allerdings die stärkste Aufnahme statt, wobei endogene β -Glukosidasen den Zuckeranteil abspalten (Seeram et al., 2001). Die Aglykone sind hydrophober und kleiner, so dass sie die Dünndarm-Epithelschicht leichter passiv penetrieren als die Glykoside. Nicht absorbierte Anthocyane erreichen den Dickdarm, wo nur noch eine sehr geringe Absorption stattfindet und sie auf hydrolysierende Mikroorganismen treffen. Allgemein verbleiben komplexer aufgebaute Anthocyane wie Di- oder Triglykoside länger im Darm als einfache Anthocyane wie Monoglykoside (Kaume et al., 2011). Die vom GIT aufgenommenen Anthocyanidine und Anthocyane werden durch Enzyme des Phase-II-Detoxifikationsmetabolismus verstoffwechselt und die konjugierten Metabolite über den Urin oder wie nicht-absorbierten Anthocyane über den Fäzes ausgeschieden (He & Giusti, 2010; Crozier et al., 2009; Manach et al., 2005).

Bedeutsam sind Anthocyane aufgrund vielfältig untersuchter gesundheitsfördernder Eigenschaften. Sie fungieren als Antioxidantien, einerseits durch das Abfangen von ROS und andererseits verhindern Fe-chelatierende Eigenschaften einiger Anthocyane die ROS-Bildung (Perron & Brumaghim, 2009). Anthocyane zeigen eine antimikrobielle Wirkung gegen z.B. *L. monocytogenes* (Lacombe et al., 2013; Sagdic et al., 2013; Che Omar et al., 2013), *E. coli* (Lacombe et al., 2013), *S. aureus* (Che Omar et al., 2013; Sagdic et al., 2013), *Yersinia enterocolitica* (Sagdic et al., 2013), *Streptococci*, *Branhamella catarrhalis* und einen antiviralen Effekt gegen das humanpathogene Influenzavirus (Krawitz et al., 2011). Anthocyane haben antikanzerogene (Hadi et al., 2007), antithrombotische, antidiabetische, Blutdruck- und Cholesterinspiegel-senkende sowie antiinflammatorische, immunmodulierende und verdauungsfördernde Wirkungen (Scalbert et al., 2005; Kim et al., 2012). Dabei hemmen sie die gefährliche Lipidperoxidation, DNA-Schädigungen, wirken entzündlichen und oxidativen Prozessen und den damit verbundenen Erkrankungen entgegen. Ein schützender Effekt der Anthocyane wird z.B. bei Arthritis (Jean-Gilles et al., 2011), Adipositas (Tsuda, 2008), Diabetes, Lipidstoffwechselstörungen, koronare Herzerkrankungen und Krebs postuliert (Zhang et al., 2005; Cooke et al., 2005; He & Giusti, 2010). Weitere

gesundheitsfördernde Eigenschaften von Anthocyanen werden im Rahmen von Studien an neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer- oder Parkinsonerkrankungen beschrieben, da die Flavonoide die Blut-Hirn-Schranke passieren und bei wichtigen Signalfunktionen involviert sind (Kelsey et al., 2011; Kaume et al., 2011).

1.4.2 Antimikrobielle Peptide (AMP) aus Insekten

1.4.2.1 Herkunft

Antimikrobiell wirksame Peptide sind in der Natur weit verbreitet und werden sowohl von Mikroorganismen als auch von mehrzelligen Organismen im Pflanzen- und Tierreich synthetisiert. Ein enormes Reservoir für potenzielle, neuartige Antiinfektiva stellen AMP aus verschiedenen Insekten, der artenreichste Klasse der Tiere (ca. eine Million charakterisierte Arten), dar (Bulet & Stöcklin, 2005). Als Teil ihres angeborenen Immunsystems nutzen Insekten AMP um mikrobiellen Belastungen entgegenzuwirken und Pathogene direkt zu vernichten. In verschiedenen Datenbanken lassen sich detaillierte Informationen über AMP beziehen. AMP haben typischerweise <40 AS, wirken schnell und systemisch, zeigen ein breites Aktivitätsspektrum mit hoher Affinität gegenüber bakteriellen Zellmembranen, sind stabil gegenüber einer Proteolyse und die Gefahr einer Resistenzentwicklung ist limitiert (Bulet et al., 2004). Die Datenbank *The Antimicrobial Peptide Database* (APD) wird regelmäßig ergänzt und enthält >2400 AMP (Mai 2014). Diese werden in die Datenbank aufgenommen, wenn sie natürlichen Ursprungs sind (Bakterien, Pilze, Pflanzen, Tiere), ihre antimikrobielle Aktivität (minimale Hemmkonzentration (MHK) <100 μ M oder <100 μ g/ml) bekannt, die AS-Sequenz zumindest teilweise aufgeklärt ist und deren ausgereiftes Peptid aus <100 AS besteht (Wang & Wang, 2009).

1.4.2.2 Einteilung, Struktur und Aufbau

Die AMP können in drei verschiedene strukturelle Klassen eingeteilt werden, trotz teilweise geringer Vergleichbarkeit ihrer AS-Sequenzen: (1) lineare α -helikale Peptide ohne die AS Cystein (Cys), (2) Peptide mit globulärer β -Faltblatt Struktur, die durch intramolekulare Disulfidbrücken stabilisiert werden und (3) Peptide mit einer ungewöhnlichen Verteilung einiger AS wie Prolin (Pro), Glycin (Gly), Arginin (Arg), Tryptophan (Trp) oder Histidin (His) (Vilcinskas, 2011). Bei homometabolen Insekten werden α -helikale AMP im Fettkörper (funktionell äquivalent zur mammalischen Leber), im Blut- bzw. in den Epithelzellen produziert, während sie bei heterometabolen Insekten in den Hämocyten produziert und bei Infektion in die Hämolymphe abgegeben werden (Bulet et al., 2004; Bulet & Stöcklin, 2005).

Zu den linearen α -helikale Peptide gehören die *Cecropine* wie beispielsweise *Cecropin A* von *Hyalophora cecropia* mit einer für *Cecropine* charakteristischen AS Trp an Position 2 und der C-terminalen Amidierung, die auch bei *Sarcotoxin 1A* und *Stomoxyn* vorkommt. Ebenso weisen die AMP *Ceratotoxin* und *Spinigerin* eine α -helikale Struktur auf (Vilcinskas, 2011). Durch intramolekulare Disulfidbrücken werden zahlreiche AMP stabilisiert, wobei diese typischerweise kovalente Bindungen zwischen den Schwefel-Atomen zweier Cys enthalten. Beispiele für Disulfid-stabilisierte AMP sind *Gallerimycin* und *Defensin Tca1*. Bei der Strukturgruppe der Pro-reichen AMP tritt die AS Pro meist in Dubletts oder Tripletts in Gesellschaft von Arg auf. Das charakteristische PRP- oder PHP-Motiv kommt bei allen bekannten kurz- (<20 AS) und vielen langkettigen (>20 AS) Pro-reichen AMP vor (Tab. 5). Da das Stickstoffatom von Pro in der Peptidgruppe nicht mit einem H-Atom verbunden ist, kann keine Wasserstoffbrückenbindung ausgebildet werden. An diesen Positionen einer Polypeptidkette kommt es zur Störung der Sekundärstruktur (Bulet & Stöcklin, 2005).

1.4.2.3 Wirkmechanismen der AMP

Die Wirkung der AMP beruht auf der Permeabilisierung und einer durch elektrostatische Interaktion verursachten Bindung der AMP an die Membranen. Helikale und die Mehrzahl der Cys-stabilisierten AMP töten dabei die Bakterien innerhalb von Minuten, während die Wirkung von kurzkettigen, Pro-reichen AMP erst nach Stunden eintritt (Bulet & Stöcklin, 2005). Die detaillierten Wirkmechanismen der verschiedenen AMP sind sehr unterschiedlich. Die meisten AMP besitzen bei physiologischem pH-Wert eine positive Nettoladung, da sie sich im Allgemeinen aus mehr positiv geladenen AS wie Arg und Lysin (Lys) als negativ geladenen wie Asparagin- (Asp) und Glutaminsäure (Glu) zusammensetzen (Bulet et al., 2004). Die Zellwand Gram-positiver Bakterien enthält negativ geladene Teichonsäuren, während auf der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien Lipopolysaccharid (LPS) lokalisiert ist, wodurch ihre Oberflächen negativ geladen sind. Die Adsorption der AMP und ihre Integration in die Membranen resultiert aus einer Expansion ihres äußeren Faltblattes, wobei es zur Membranverdünnung kommt. Neben diesem Mechanismus wird eine konzentrationsabhängige, verschiedenartige Porenbildung als Aufnahmemechanismus für die amphiphilen AMP postuliert. Nach dem toroidalen Modell aggregieren die Peptide, wodurch sowohl die AMP als auch die lipophilen Kopfgruppen der Membran den hydrophilen Kanal auskleiden (Abb. 8A). Nach dem linearen Schlauchporen-Modell ordnen sich die hydrophoben AMP-Regionen an die lipophile Phase der Membran an und die hydrophilen AMP-Regionen bilden die innere Oberfläche des Porenkanals (Abb. 8B). Das Teppich-Modell geht davon aus, dass sich

die AMP parallel zur Membranoberfläche ausrichten und bei höheren Konzentrationen die Membran durch Mizellenbildung zerstören (Abb. 8C) (Vilcinskas, 2011).

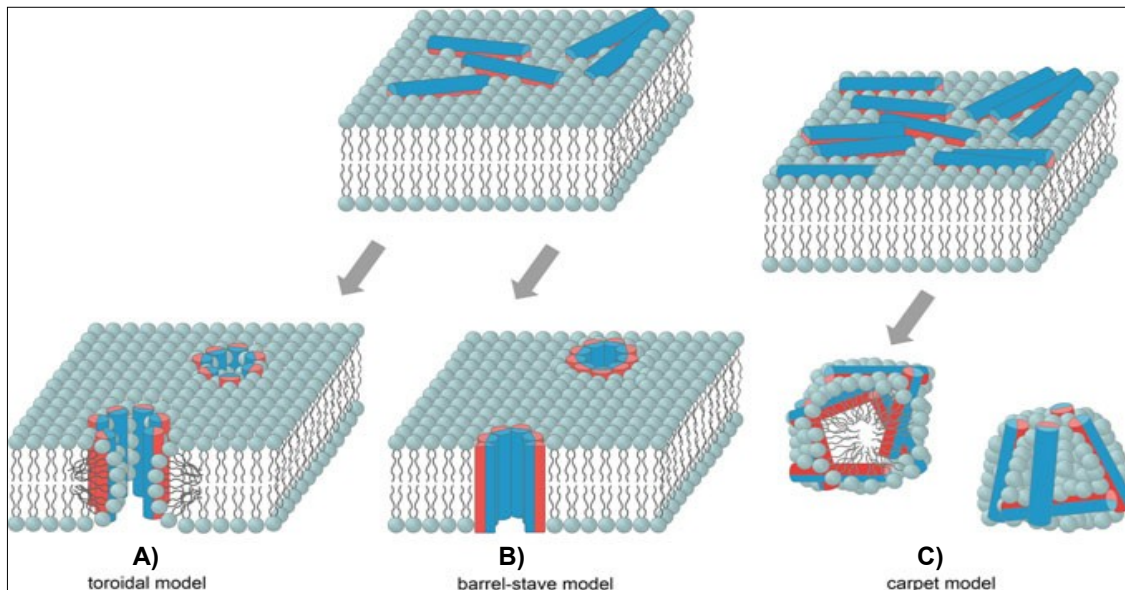


Abb. 8: Modelle der Porenbildung und Zerstörung der Lipiddoppelschicht durch AMP

A: Toroidales Modell. **B:** Lineares Schlauchporen-Modell. **C:** Teppich-Modell (Vilcinskas, 2011).

Wie beschrieben üben die meisten bekannten AMP ihre Aktivität durch Zerstörung der bakteriellen Membran mittels Porenbildung aus, die Wirkung von z.B. *Drosocin*, *Pyrrhocoricin* und *Apidaecinen* ist hingegen auf die Interaktion mit einem stereoselektiven Targetmolekül Gram-negativer Bakterien zurückzuführen und nicht auf Poren-bildende Prozesse (Bulet et al., 1996; Gobbo et al., 2002; Bulet & Stöcklin, 2005). Diese AMP binden an die multi-helikale Deckelregion des bakteriellen Hitzeschockproteins DnaK (70 kDa). Diese Anlagerung verhindert die Chaperon-unterstützte Proteinfaltung und die ATPase-abhängige Aktivität von DnaK (Kragol et al., 2002; Kragol et al., 2001; Morell et al., 2008; Zhu et al., 1996).

1.5 Invertebraten-Infektionsmodell *Galleria mellonella*

Die beschriebenen potenziell antimikrobiellen Substanzen (Anthocyane, AMP) können für ein primäres *in vivo*-Screening ihrer Effektivität in Larven der Großen Wachsmotte *G. mellonella* gespritzt werden. Dieser für Laborexperimente einzigartige Organismus mit folgender Phylogenie (Tab. 2) ermöglicht es im Hochdurchsatzverfahren wirksame Substanzen zuverlässig zu identifizieren (UniProt, 2013; Nuss et al., 2012; Nuss et al., 2003-2011).

Tab. 2: Taxonomie von *Galleria mellonella*

Stamm (Phylum)	Gliederfüßer (<i>Arthropoda</i>)
Unterstamm (Subphylum)	Sechsfüßer (<i>Hexapoda</i>)
Klasse	Insekten (<i>Insecta</i>)
Ordnung	Schmetterlinge (<i>Lepidoptera</i>)
Superfamilie	Zünslerfalter (<i>Pyraloidea</i>)
Familie	Zünsler (<i>Pyralidae</i>)
Unterfamilie	Wachsmotten (<i>Galleriinae</i>)
Gattung	<i>Galleria</i>
Art	Große Wachsmotte (<i>Galleria mellonella</i>)

Die Ordnung der *Lepidoptera* umfasst Motten und Schmetterlinge und stellt mit über 150.000 Spezies nach der Ordnung der Käfer (*Coleoptera*) die zweitartenreichste Ordnung im Tierreich dar (Goldsmith & Marec, 2010). Innerhalb der Ordnung der *Lepidoptera* können 46 Superfamilien und 126 Familien unterschieden werden. Eine dieser Superfamilien ist die der *Pyraloidea*, die sogenannten Zünslerfalter mit etwa 16.000 beschriebenen Arten. Bedeutung für die Menschheit hat die Insektenordnung der *Lepidoptera* in der Land- und Forstwirtschaft, in denen die Insekten als Schädlinge negative Auswirkungen haben können. Andererseits wirken zahlreiche Vertreter der *Lepidoptera* an der Blütenbestäubung in der Flora mit und bieten eine wichtige Nahrungsquelle in der Fauna. Vertreter der *Lepidoptera* sind wie auch die Ordnungen *Diptera* (Fliegen), *Coleoptera* (Käfer) und *Hymenoptera* (Wespen, Bienen, Ameisen) holometabole Insekten. In Abgrenzung zu den hemimetabolen Insekten entwickeln sie sich in einer vollständigen Metamorphose vom Larven-, über ein Puppenstadium zum ausgewachsenen Insekt (Imago), wobei das Insekt keine Ähnlichkeit mehr mit der Larve zeigt und oftmals eine andere Lebensweise hat.

G. mellonella bietet als Versuchsorganismus für humanpathogene Mikroorganismen herausragende Vorteile. Neben den in Kap. 3.1.2 detailliert beschriebenen kostengünstigen Aufzucht- und Haltungsbedingungen sind die anspruchsarmen Larven der Großen Wachsmotte weltweit, ganzjährig schnell und preiswert verfügbar, ethisch akzeptiert und aufwendige Tierversuchsanträge entfallen. Normalerweise werden die Larven als Tierfutter für beispielsweise Reptilien oder als Angelköder angeboten. Larven von *G. mellonella* haben im letzten Larvenstadium ein Körpergewicht von durchschnittlich 150-200 mg und sind ca. 2-3 cm lang. Dies ermöglicht eine unkomplizierte und rapide Injektion von Bakterien und Testsubstanzen in die Hämolymphe. Der entscheidende Vorteil ist ihre Toleranz, denn unter natürlichen Bedingungen lebt *G. mellonella* als Parasit in Bienenstöcken. Daher tolerieren die Larven Temperaturbedingungen von 37°C, bei der viele krankheitsverursachende Mikroorganismen Pathogenitäts- oder Virulenzfaktoren

exprimieren. Tierarten wie Mäuse, Ratten oder andere Nagetiere stellen zwar geeignete Modelle für die Untersuchung von humanen Infektionen dar. Diesen Infektionsmodellen stehen jedoch ein hoher Kosten- und Zeitaufwand sowie ethische Kritik gegenüber. Neben logistischen Problemen erhöht die Existenz eines adaptiven und angeborenen Immunsystems bei Vertebraten-Versuchstieren die Komplexität der Immunreaktion (Vilcinskas, 2011).

Insekten haben im Gegensatz zur angeboren und adaptiven Immunabwehr von Wirbeltieren nur ein angeborenes Immunsystem, das humorale und zelluläre Immunantworten umfasst (Abb. 9). Durch Bindung von Plasmaproteinen in der Hämolymphe an mikrobielle Oberflächenstrukturen werden infektiöse Mikroorganismen erkannt. Diese „Mustererkennung“ (*pattern recognition*) führt zur Auslösung der verschiedenen Immunantworten. Die humorale Antwort des angeborenen Immunsystems ist intensiver erforscht als die zelluläre, wobei eine Homologie zwischen dem angeborenen Immunsystem von Vertebraten und Invertebraten existiert (García-Lara et al., 2005; Jiang et al., 2010) (Abb. 9).

Die humorale Antwort besteht aus der unmittelbaren Aktivierung einer Phenoloxidase-Kaskade und der Synthese von AMP im Fettgewebe der Insekten über einen Zeitraum von Stunden, die in die *Hämolymphe* sezerniert werden. Melanisierung beschreibt dabei einen komplexen Abwehrmechanismus der angeborenen Immunantwort, bei dem Tyrosin in für Mikroorganismen toxisches Melanin durch einen Phenoloxidase und andere beteiligte Enzyme konvertiert und der an Koagulation und Wundheilung beteiligt ist. Neben diesen Aufgaben nutzen Insekten die Melanisierung, um pathogene Faktoren von einer harten, proteinogenen Kapsel zu begrenzen (Fauvarque & Williams, 2011; De Gregorio et al., 2001).

Die zelluläre Immunantwort wird innerhalb von Minuten nach Infektion durch Hämozyten vermittelt (Gandhe et al., 2007). Die Hämozyten der Insekten sind bei der Wundheilung und Koagulation von Bedeutung und werden als frühe Antwort auf eine Infektion aktiviert. Die beiden Hämozytentypen Plasmatozyten und Granularzellen sind bei der Nodulierung, Einkapselung und Phagozytose von Pathogenen und bei der Entsorgung von apoptotischem Gewebe beteiligt (Jiang et al., 2010). Nodulierung beschreibt den quantitativ wichtigsten Abwehrmechanismus gegenüber bakteriellen, fungalen und viralen Infektionen bei Insekten. Dabei bilden sich Aggregate von Hämozyten um den eingedrungenen Erreger. Eng verwandt mit dem Prozess der Nodulierung ist die Einkapselung, wobei dadurch insbesondere größere, invasive Pathogene wie Parasiten oder Nematoden von zahlreichen Hämozyten umringt und unschädlich gemacht werden (Gandhe et al., 2007; Desbois & Coote, 2012). Bei der Phagozytose werden pathogene Mikroorganismen an ihrer Oberflächenstruktur erkannt

und nach Bindung von Plasmaproteinen in der Hämolymphe von zirkulierenden Hämocyten aufgenommen (Fauvarque & Williams, 2011). Dabei wird das mikrobiell degradierend wirksame Enzym Lysozym in den phagozytischen Hämocyten produziert, das die mikrobielle Peptidoglykanschicht zerstört (García-Lara et al., 2005).

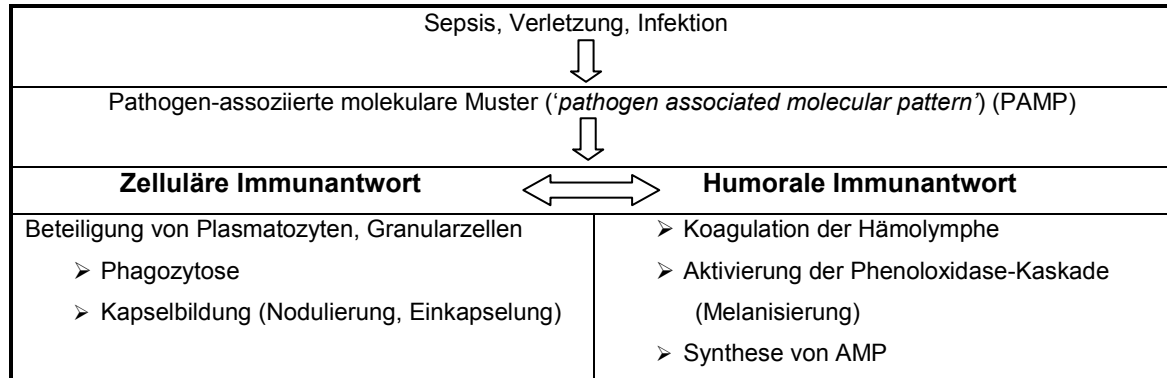


Abb. 9: Das Immunsystem von *G. mellonella*
 (eigene Darstellung nach verschiedenen Literaturangaben)

2 Zielsetzung dieser Arbeit

Viele pathogene Bakterien wie *Listeria monocytogenes* EGD-e (Gram-positiv) und der multiresistente, enteroaggregative-hämorrhagische *Escherichia coli* (EAHEC) (Gram-negativ) der Epidemie vom Mai 2011 werden über Lebensmittel übertragen.

Die vorliegende Arbeit hat sich zum Ziel gesetzt *in vitro* und *in vivo*

- 1) die Wirkung von Lebensmittelzusatzstoffen am Beispiel der häufig verwendeten Anthocyane (E 163 oder natürlicher Bestandteil von Nahrungsmitteln, z.B. in Weintrauben) exemplarisch auf die durch Lebensmittel übertragenen Erreger *L. monocytogenes* und EAHEC zu untersuchen und
- 2) auf der Suche nach antiinfektiven Substanzen gegen pathogene, multiresistente Krankheitserreger die Wirkung von potenziell antimikrobiellen Peptiden (AMP) aus Insekten auf diese beiden Erreger und weitere multiresistente Erreger zu testen. Der Einsatz dieser AMP ist dabei nicht nur zur Behandlung von infizierten Patienten denkbar, sondern auch als „Konservierungsstoff“ in Lebensmitteln gegen Krankheitserreger oder zur Prophylaxe von Infektionen in Tiermastbetrieben.

Dabei soll das ethisch akzeptierte Insekteninfektionsmodell *Galleria mellonella* für die *in vivo*-Untersuchung der Anthocyan- und AMP-Wirkung etabliert werden.

Durch Isolierung und Zellkultur von Hämocyten aus *G. mellonella* sollen Interaktionen der Krankheitserreger mit dem Wirtsorganismus aufgezeigt werden.

Transkriptomanalysen mittels *Next generation sequencing* (NGS) mit dem System von Ion Torrent™ sollen die Wirkmechanismen aufschlüsseln, die den antimikrobiellen (*L. monocytogenes*) bzw. promikrobiellen (EAHEC) Effekten des Anthocyan-reichen Traubenextraktes *Dakapo* zugrunde liegen.

Die Untersuchung der isolierten Anthocyane Delphinidin-3-Glukosid (Eisen-komplexierend) und Malvidin-3-Glukosid (nicht-Eisen-komplexierend) soll Hinweise geben, welche Substanzen des komplexen Beerenextraktes *Dakapo* für die divergierenden Wachstumseffekte verantwortlich sind.

In *L. monocytogenes* werden die Effekte einer Eisensupplementation, Glukose, Veränderung der Sauerstoffverfügbarkeit und Antibiotika in Kombination mit *Dakapo* untersucht und verschiedene Mutanten getestet.

In EAHEC wird die antioxidativen Wirkung des Traubenextraktes, sein Einfluss auf die Serumresistenz, die Eisenhomöostase und auf den sogenannten *viable-but-not-culturable* (VBNC)-Zustand charakterisiert.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Bakterienstämme

Tab. 3: Übersicht Bakterienstämme, Angaben zur Herkunft, pathogenem Potential und Kultivierung

Bakterienstamm	Herkunft	pathogenes Potential	Eigenschaften	Kultivierung (Agarplatte/Flüssigkultur)
EAHEC (2001)	41 (O104:H4 01-9591)	enteroaggregativ, HUS	fakultativ anaerob	LB-Agarplatte/LB
EAHEC (2011)	ST3305 (Gießen), PI	enteroaggregativ, HUS, multiresistent	fakultativ anaerob	LB-Agarplatte/LB +2 µg/ml CTX
EAHEC (2011)	S102644 (Frankfurt), PI	enteroaggregativ, HUS, multiresistent	fakultativ anaerob	LB-Agarplatte/LB +2 µg/ml CTX
EAHEC (2011)	E3503 (Lübeck), PI	enteroaggregativ, HUS, multiresistent	fakultativ anaerob	LB-Agarplatte/LB +2 µg/ml CTX
EAHEC (2011)	ST3431 (Marburg), PI	enteroaggregativ, HUS, multiresistent	fakultativ anaerob	LB-Agarplatte/LB +2 µg/ml CTX
EHEC	EDL933 1051	hämorrhagische Kolitis, hämolytische Anämie, Thrombozytopenie, HUS	fakultativ anaerob	LB-Agarplatte/LB
<i>Enterococcus faecalis</i>	DSM 16431, probiotisch	apathogen	fakultativ anaerob	BHI-Agarplatte/BHI
<i>Enterococcus faecalis</i>	V583 ENT1002 (VRE)	HWI, Lokalinfectionen	fakultativ anaerob	BHI-Agarplatte/BHI
<i>Escherichia coli</i>	ECO1069 MG1655	apathogen	fakultativ anaerob	LB-Agarplatte/LB
<i>Escherichia coli</i>	ECO1080 K12	apathogen	fakultativ anaerob	LB-Agarplatte/LB
<i>Escherichia coli</i> Δfur	ME8332 K12	apathogen	fakultativ anaerob	LB-Agarplatte/LB
<i>Escherichia coli</i>	CTX-M-15414 (ESBL) (Ali Ahmed, 2012)	HWI, Sepsis, Diarrhö, multiresistent	fakultativ anaerob	LB-Agarplatte/LB +2 µg/ml CTX
<i>Escherichia coli</i>	CTX-M-15672 (ESBL)	HWI, Sepsis, Diarrhö, multiresistent	fakultativ anaerob	LB-Agarplatte/LB +2 µg/ml CTX
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	MS39 (ESBL)	Pneumonie, Pleuritis, Bronchitis, Sinusitis, HWI, Sepsis, multiresistent	fakultativ anaerob	LB-Agarplatte/LB +2 µg/ml CTX
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD-e (Wt)	LMO1052	(kon natale) Listeriose, Abort, Septikämie	fakultativ anaerob	BHI-Agarplatte/BHI
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD-e Δlmo0263 (ΔinlH)	LMOM1128	(kon natale) Listeriose	fakultativ anaerob	BHI-Agarplatte/BHI
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD-e Δlmo0319 (Δbgl2)	EDCC 2240	(kon natale) Listeriose	fakultativ anaerob	BHI-Agarplatte/BHI
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD-e Δlmo0415	LMOM1363	(kon natale) Listeriose	fakultativ anaerob	BHI-Agarplatte/BHI
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD-e Δlmo0555 (ΔdtpT)	LMOM1330	(kon natale) Listeriose	fakultativ anaerob	BHI-Agarplatte/BHI
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD-e Δlmo0610	LMOM1405	(kon natale) Listeriose	fakultativ anaerob	BHI-Agarplatte/BHI
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD-e Δlmo0880	LMOM1406	(kon natale) Listeriose	fakultativ anaerob	BHI-Agarplatte/BHI
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD-e Δlmo0943 (Δfri)	LMOM1240	(kon natale) Listeriose	fakultativ anaerob	BHI-Agarplatte/BHI
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD-e Δlmo1054	LMOM1395	(kon natale) Listeriose	fakultativ anaerob	BHI-Agarplatte/BHI
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD-e Δlmo1364 (ΔcspA)	LMOM1024	(kon natale) Listeriose	fakultativ anaerob	BHI-Agarplatte/BHI
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD-e Δlmo1439 (ΔsodA)	LMOM1188	(kon natale) Listeriose	fakultativ anaerob	BHI-Agarplatte/BHI
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD-e Δlmo1580	LMOM1335	(kon natale) Listeriose	fakultativ anaerob	BHI-Agarplatte/BHI
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD-e Δlmo1978	LMOM1393	(kon natale) Listeriose	fakultativ anaerob	BHI-Agarplatte/BHI
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD-e Δlmo2196 (ΔoppA)	LMOM1266	(kon natale) Listeriose	fakultativ anaerob	BHI-Agarplatte/BHI
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD-e Δlmo2673	LMOM1334	(kon natale) Listeriose	fakultativ anaerob	BHI-Agarplatte/BHI
<i>Staphylococcus aureus</i>	EDCC 5398 T625930, PI (MRSA)	Wundinfektionen, Sepsis	fakultativ anaerob	BHI-Agarplatte/BHI

3.1.2 Larven der Großen Wachsmotte *G. mellonella*

Für die Infektion mit Bakterien und das *in vivo*-Screening potenziell antimikrobieller Substanzen wurden Wachsaupen (*Galleria mellonella*) (Zuchtansätze, Art.-Nr. 527) der Firma fauna topics Zoobedarf, Zucht- und Handels GmbH (Marbach/N.-

Rielingshausen) verwendet (Abb. 10). Die Larven wurden in großen Petrischalen (145/20 mm, Greiner Bio-One GmbH) mit einer Futtermischung bestehend aus Maismehl (22 %), Weizenkeimen (22 %), Trockenhefe (11 %), Bienenwachs (17,5 %), Honig (11 %) und Glycerin (11 %) bei 30 °C lichtgeschützt aufgezogen.

3.1.3 Bereitstellung der Pflanzenextrakte

Im Rahmen eines Drittmittel-geförderten BMBF-Projektes in Kooperation mit der Forschungsanstalt Geisenheim, Fachgebiet Weinanalytik und Getränkeforschung (Prof. Dr. H. Dietrich) wurden die Anthocyan-haltigen Beerenextrakte (*Dakapo*, *Accent*, Heidelbeere) zur Verfügung gestellt (Dietrich et al., 2009). Das patentrechtlich geschützte 3,2 % Rubini-Holunderbeer-Liquid wurde von der Firma BerryPharma AG (Leichlingen) hergestellt (Tab. 4; Anhang A2) (Krawitz et al., 2011). Dabei ist zu beachten, dass es sich um natürliche Produkte handelt, deren Gehalte an einzelnen Inhaltsstoffen Schwankungen unterliegen, bedingt durch Faktoren wie Jahrgang, Sorte, Erntezeitpunkt, Klima und Wetter, Boden, Düngung, Pilzbefall, Insekten, Verarbeitung, Lagerbedingungen und Alterung.

Tab. 4: Anthocyangehalt der Beerenextrakte *Dakapo*, *Accent*, Heidelbeere und Holunderbeer-Liquid (g/100 g) (n.b. = nicht bekannt; n.n. = nicht nachweisbar)

Inhaltsstoffe		<i>Accent</i>	<i>Dakapo</i>	Heidelbeere	Holunder
Anthocyanin	Cyanidin	0,9	0,5	7,9	7,2
	Delphinidin	4,1	2,6	5,3	n.b.
	Malvidin	9,5	10,3	3,2	n.b.
	Pelargonidin	n.b.	n.b.	n.b.	0,3
	Peonidin	4,9	5,7	1,9	n.b.
	Petunidin	4,3	3,9	1,7	n.b.
	Gesamtgehalt Anthocyane	23,7	23,0	20,0	7,5
Zucker	Glukose	n.n.	n.n.	n.n.	2,09
	Fruktose	n.n.	n.n.	n.n.	1,94
	Gesamtgehalt Zucker	n.n.	n.n.	n.n.	4,03

3.1.4 Bereitstellung der Insektenpeptide

Die Insektenpeptide wurden im Rahmen des LOEWE-Schwerpunktes „Insektenbiotechnologie“ von Herrn Prof. Dr. A. Vilcinskas und Herrn PD Dr. J. Wiesner vom Technologie- und Innovationszentrum Gießen GmbH, Fraunhofer-Institut (Gießen) als Lyophilisat bezogen (Tab. 5).

Tab. 5: Insektenpeptide

Peptid	Organismus	Aminosäuresequenz	Anzahl AS	MW** [Da]	Strukturklasse
Abaecin	<i>Bombus pascuorum</i>	H-FVPYNPPRPGQSKPFPSFGHGPFNPKIQWPYPLP NPGH -OH	39	4395,0	langkettig Pro-reich
Alo3 (Rohpeptid)	<i>Acrocinus longimanus</i>	H-CIKNGNGCQPNQSGNGCCSGYCHKQPGWVAGYC RRK-OH	36	3875,3	Cys-reich
Apidaecin	<i>Bombus pascuorum</i>	H-GNRPVYIPPRPPHRL-OH	17	1963,3	kurzkettig Pro-reich
Apidaecin 1A	<i>Apis mellifera</i>	H-GNNRPVYIPQRPHPRI-OH	18	2108,4	kurzkettig Pro-reich
Cecropin A	<i>Aedes aegypti</i>	H-GGLKKLGKKLEGAGKRVFNAAEKALPVVAGAKALR K-OH	36	3675,4	linear α -helikal
Cecropin A	<i>Hyalophora cecropia</i>	H-KWKLFKKIEKVGQNRDGIKAGPAVAVVGQATQIA K-NH ₂ *	37	4004,8	linear α -helikal
Cecropin-D-like-peptide	<i>Galleria mellonella</i>	H-ENFFKEIERAGQRIRDAISAAPAVETLAQAQKIIGG D-OH	39	4255,8	linear α -helikal
Ceratotoxin	<i>Ceratitis capitata</i>	H-SIGSAFKKALPVAKKIGKAALPIAKAALP-OH	29	2860,5	linear α -helikal
Defensin (Rohpeptid)	<i>Aeshna cyanea</i>	H-GFGCPLDQMQRHRCQTITGRSGGYCSGPLKITC TCYR-OH	38	4179,8	Cys-reich
Defensin Tca1	<i>Tribolium castaneum</i>	H-VTCDLLSAEAKGVKNHAACAAHCLLRKRGGYC NKRRICVCRN-OH	44	4830,7	Cys-reich
Tca1randomSS (Rohpeptid)	<i>Tribolium castaneum</i>	H-VTCDLLSAEAKGVKNHAACAAHCLLRKRGGYC NKRRICVCRN-OH	44	4830,7	Cys-reich
Tca2randomSS (Rohpeptid)	<i>Tribolium castaneum</i>	H-FTCDVLSAEGSFRGVSVKLNHSACATHCLFLKKRG GYCEN KAICV CRN-OH	48	5166,0	Cys-reich
Tca3randomSS (Rohpeptid)	<i>Tribolium castaneum</i>	H-FTCDVLSAEGGFRGVSIKLNHAACAAHCLYLKKRG GYCNDKAVCVCRK-OH	48	5223,0	Cys-reich
Drosocin	<i>Drosophila melanogaster</i>	H-GKPRPYSRPTSHPRPIRV-OH	19	2198,5	kurzkettig Pro-reich
Drosomycin (Rohpeptid)	<i>Drosophila melanogaster</i>	H-DCLSGRYKGPACVWDNETCRRVCKEEGRSSGHC SPSLKC WCEGC-OH	44	4897,5	Cys-reich
Formaecin-1	<i>Myrmecia gulosa</i>	H-GRPNPVNNKPTPHRL-OH	16	1794,0	kurzkettig Pro-reich
Gallerimycin (Rohpeptid)	<i>Galleria mellonella</i>	H-GVTITVKPPFGCVFYECIANCRSRGYKNGGYCTIN GCQCQCIR-OH	43	4724,5	Cys-reich
Heliomicin (Rohpeptid)	<i>Heliothis virescens</i>	H-DKLIGSCVWGVAVNYTSDCNGECKRRGYKGGHCG SFANVNCWCET-OH	44	4790,3	Cys-reich
Lebocin-1	<i>Bombyx mori</i>	H-DLRFLYPRGKLPVPTPPFPNPKPIYIDMGNYR-OH	32	3773,4	langkettig Pro-reich
Metalnikowin-1	<i>Palomena prasina</i>	H-VDKPDYRPRPRPNM-OH	15	1838,1	kurzkettig Pro-reich
Metalnikowin-2A	<i>Palomena prasina</i>	H-VDKPDYRPRPWPRPN-OH	15	1893,1	kurzkettig Pro-reich
Metchnikowin-1	<i>Drosophila melanogaster</i>	H-HRHQGPIDTRPSFPNPNQPRPGPIY-OH	26	3026,3	langkettig Pro-reich
Metchnikowin-2	<i>Drosophila melanogaster</i>	H-HRRQGPIDTRPSFPNPNQPRPGPIY-OH	26	3045,4	langkettig Pro-reich
Pyrrhocoricin	<i>Pyrrhocoris apterus</i>	H-VDKGSYLPRPTPPRIYNRN-OH	20	2340,6	kurzkettig Pro-reich
Sapecin (Rohpeptid)	<i>Sarcophaga peregrina</i>	H-ATCDLLSGTGINSACAAHCLLRGNGGYCNGKA VCVCN-OH	40	4080,6	Cys-reich
Sarcotoxin 1A	<i>Sarcophaga peregrina</i>	H-GWLKKIGKKIERVGVQHTRDATIQGLGIAQQAANVAA TAR-NH ₂ *	39	4156,8	linear α -helikal
Spinigerin	<i>Pseudacantho-termes spiniger</i>	H-HVDKKVADKVLKQLRIMRLTRL-OH	25	3000,7	linear α -helikal
Stomoxyn	<i>Stomoxys calcitrans</i>	H-RGFRKHFNKLVKKVKHTISETAHVAKDTAVIAGSGA AVVAAT -NH ₂ *	42	4416,1	linear α -helikal
Termicin (Rohpeptid)	<i>Pseudacantho-termes spiniger</i>	H-ACNFQSCWATCQAQHSIYFRAFCDRSQCKCVFV RG-NH ₂ *	36	4221,8	Cys-reich

*C-terminale Amidierung; **berechnet mit ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)

3.1.5 Bereitstellung des Humanserums

Humanes Vollblut eines freiwilligen Probanden wurde zur Gewinnung des Serums zweimal zentrifugiert (5 Min., 3000 rpm; 5 Min, 13.000 rpm). Die Analysen wurden mit nativem und Hitze-inaktiviertem (56 °C, 30 Min.) Serum durchgeführt.

3.1.6 Chemikalien

Agilent High Sensitivity DNA Kit
Agilent RNA 6000 Nano Kit und 6000 Pico Kit
Alexa Fluor® 647 phalloidin, 300 units

Ampicillin für die Molekularbiologie

Agilent Technologies (Waldbronn)
Agilent Technologies (Waldbronn)
Invitrogen™ Life Technologies
(Grand Island, USA)
Carl Roth GmbH+Co. KG (Karlsruhe)

Anaerocult® A für die Mikrobiologie	Merck KGaA (Darmstadt)
Bacto™ Peptone	BD (Franklin Lakes, USA)
β-Glucosidase from <i>Caldocellum saccharolyticum</i>	Sigma-Aldrich GmbH (München)
recombinant, ≥300 units/g; G6906	
Borsäure	Merck KGaA (Darmstadt)
Cefotaxim	Fresenius Kabi Deutschland GmbH (Bad Homburg)
Ciprofloxacin (Ciprobay®)	Bayer Schering Pharma (Leverkusen)
Delphinidin-3-Glucosid (Myrtillinchloride)	Extrasynthese (Genay Cedex, France)
Dimethylformamide reserach grade	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg)
Dimethylsulfoxid für die Gas-Chromatographie	Merck KGaA (Darmstadt)
Eisen(II)-chlorid-Tetrahydrat; zur Analyse	Merck KGaA (Darmstadt)
Eisen(III)-citrat granuliert	Merck KGaA (Darmstadt)
Ethanol, puriss. p.a., absolute, ≥99.8 %	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH+Co. KG (Karlsruhe)
Formaldehyd 16 % methanol-free, Ultra Pure	Polyscience, Inc. (Warrington, England)
Formic acid, puriss. p.a., ~98 %, 06440 Fluka	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Gentamycin Sulfate	Merck KGaA (Darmstadt)
Glucose-D(+)-Monohydrat für die Mikrobiologie	Merck KGaA (Darmstadt)
Glycerin wasserfrei zur Synthese	Merck KGaA (Darmstadt)
Hydroxyphenylfluorescein (HPF)	Life Technologies GmbH (Darmstadt)
Immersionsöl für die Mikroskopie	Merck KGaA (Darmstadt)
Isotone Natriumchloridlösung, 0,9 %	B. Braun Melsungen AG (Melsungen)
Kaliumchlorid zur Analyse EMSURE®	Merck KGaA (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat wasserfrei, Suprapur®	Merck KGaA (Darmstadt)
Lambda Ladder PFG Marker (50 µg/ml)	New England Biolabs GmbH (Frankfurt a. M.)
LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit, L7012	Invitrogen GmbH (Darmstadt)
LL-37 amide, Trifluoroacetate salt	Bachem AG (Bubendorf, Schweiz)
Low Range PFG Marker (25 µg/ml)	New England Biolabs GmbH (Frankfurt a. M.)
Lysozym (from egg white)	Merck KGaA (Darmstadt)
Malvidin-3-Glucosid (Oeninchloride)	Extrasynthese (GenayCedex, France)
Meropenem (Meronem®)	AstraZeneca (Wedel)
miRNeasy Mini Kit (50) For 50 preps	Qiagen (Hilden)
Methanol, 99,8 %	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Mutanolysin from <i>Streptomyces globisporus</i>	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
ATCC 21553, ≥4000 units/mg protein (biuret)	
Natriumchlorid, ≥99,5 %, p.a.	Carl Roth GmbH+Co. KG (Karlsruhe)
Natriumhydroxid Plättchen zur Analyse	Merck KGaA (Darmstadt)
N-Lauroylsarcosine sodium salt, ≥99.0 %	Fluka, Sigma-Aldrich (Steinheim)
N-Phenylthiourea, ≥98 %	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
4-Nitrophenyl β-D-glucopyranoside, ≥98 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Paraquat dichloride, PESTANAL®, analytical standard	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
PBS-Lösung ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , low endotoxin	Dulbecco, Biochrom AG (Berlin)
ProLong® Gold antifade reagent with DAPI	Life Technologies GmbH (Darmstadt)
Proteinase K, lyophilisiert, ≥30 u/mg	Carl Roth GmbH+Co. KG (Karlsruhe)
Proteinase K Solution, (20 mg/ml), 10000 u	Ambion® Life Technologies (Grand Island, USA)
Pyrocatechol ≥99 %, powder	Sigma-Aldrich GmbH (München)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
QuantiTec® SYBR®Green PCR Kit	Qiagen (Hilden)
Ribo-Zero™ Magnetic Kit (Bacteria)	Epicentre Biotechnologies (Madison, USA)
Rifampicin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
RNAprotect Bacteria Reagent	Qiagen (Hilden)

RNase-Free DNase Set
Sodium Phosphate, Dibasic,
Molecular Biology Grade (Na_2HPO_4)
Sodium phosphate dibasic $\geq 99.0\%$
Superase-InTM 20 u/ μl

SuperScript® II Reverse Transcriptase

Tris, 1 M, pH 7.0 buffer is certified RNase-free

Tris, Handelsname PUFFERAN®, $\geq 99.9\%$
Triton® X-100

Wasserstoffperoxidlösung, 3 %

Qiagen (Hilden)
Merck KGaA (Darmstadt)

Sigma-Aldrich GmbH (München)
Ambion®, Life Technologies
(Grand Island, USA)
InvitrogenTM, Life Technologies
(Grand Island, USA)
Ambion®, Life Technologies
(Grand Island, USA)
Carl Roth GmbH+Co. KG (Karlsruhe)
SERVA Electrophoresis GmbH
(Heidelberg)
Otto Fischar GmbH & Co. KG,
(Saarbrücken)

3.1.7 Flüssignährmedien und Agarplatten

BHI-Nährmedium (Hirn-Herz-Bouillon)

15 g/l BD BactoTM Agar (Zusatz bei BHI-Agarplatten)

Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon (TSB)
für die Mikrobiologie

Columbia Agar with sheep blood plus

Grace's Insect Medium; G8142

LB-Medium (*lysogeny broth*)

10 g/l BD BactoTM Tryptone, Enzymatic digest of casein

5 g/l BD BactoTM Yeast Extract

10 g/l Natriumchlorid

15 g/l BD BactoTM Agar (Zusatz bei LB-Agarplatten)

Minimalmedium (MM)

6560 mg/l Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)
16420 mg/l di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)
410 mg/l Magnesium sulfate heptahydrate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
10000 mg/l Glukose (wasserfrei) oder alternativ Glycerin
100 mg/l L-Leucin
100 mg/l L-Isoleucin
100 mg/l L-Arginin
100 mg/l L-Methionin
100 mg/l L-Valin
100 mg/l L-Cystein
600 mg/l L-Glutamin
88 mg/l Eisen(III)-citrat granuliert
0,5 mg/l Riboflavin
0,5 mg/l Biotin
1 mg/l Thiamin
0,005 mg/l Thioctsäure

Yeast extract solution

Merck KGaA (Darmstadt)
Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
Merck KGaA (Darmstadt)

Oxid Deutschland GmbH (Wesel)
Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
Carl Roth GmbH+Co. KG (Karlsruhe)
Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)

Merck KGaA (Darmstadt)
Merck KGaA (Darmstadt)
Sigma-Aldrich GmbH (München)
Merck KGaA (Darmstadt)
Sigma-Aldrich GmbH (München)
Sigma-Aldrich GmbH (München)
Merck KGaA (Darmstadt)
Sigma-Aldrich GmbH (München)
Sigma-Aldrich GmbH (München)
Sigma-Aldrich GmbH (München)
Sigma-Aldrich GmbH (München)
Merck KGaA (Darmstadt)
Sigma-Aldrich GmbH (München)
Sigma-Aldrich GmbH (München)
Sigma-Aldrich GmbH (München)
Sigma-Aldrich GmbH (München)
Gibco®, Life Technologies GmbH
(Darmstadt)

3.1.8 Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien

Cellstar® Tubes, 10, 12, 50 ml

Deckgläschen (Cover slips round; 18 x 18 mm)

Disposable DeltaTM Cell Spreader

Disposable Plug Molds for the preparation of
DNA-imbedded agarose plugs

Einmalspritzen, 2-teilig, Injekt®, 2 ml

Erlenmeyerkolben, Fisherbrand®, 100 ml

Greiner BioOne GmbH
(Frickenhausen)
R. Langenbrinck, Labor- und
Medizintechnik (Emmendingen)
Heathrow Scientific LLC
(Vernon Hills, USA)
Bio-Rad Laboratoires B.V.
(Veenendaal, Niederlande)
B. Braun, Melsungen AG (Melsungen)
Fisher Scientific GmbH (Schwerte)

Feindosierungsspritzen Omnican®-F mit integrierter Kanüle, 0,01-1 ml, 0,30x12 mm
Filterpapier Whatman™ Chromatography paper

Impfeschlingen, 10 µl

Küvetten: ratiolab® Q-VETTES semi-micro
MicroAmp®Fast 96-Well Reaction Plate (0,1mL)

96 MicroWell™ Plates
Mikro-Schraubröhre, 2 ml
Multi®-SafeSeal®Tubes farblos (1,5 ml)
Objektträger: ca. 76 x 26 mm, Mattrand

Pergaminpapier 2122 Whatman® 100x100mm
Petrischalen
Petrischalen, 145/20mm; 94/15mm; 60/15mm

Petrischalenspatel Delta™; Artikel: PC59.1
Pipetten: mLINe, 0,5 -1000 µl
Pipettenspitzen (10, 20, 100, 200, 1000 µl)

Pipettenspitzen, 10 µl SafeSeal-Tips® prof.

Polypropylene Tube ®Micronic Systems,
0.75 ml v-bottom non-coded tube, LoBo rack
Präzisionspinzetten, aus Dumoxel®
Schottflaschen 100, 250, 500, 1000 ml
Standard Lids, for 96 MicroWell™ plates
Sterilfilter: MILLEX®GV Filter Unit 0.22 µm,
Durapore®PVDF Membrane

3.1.9 Geräte

Agilent 2100 Bioanalyzer

Anaerobiertopf
BD FACSCalibur Flow Cytometer
Biofuge 15
Centrifuge 5415 D (Mikrozentrifuge)
CHEF-DR® II Control Module
Digital-pH-Meter 646

Fluoreszenzmikroskop Biozero, BZ-8000

GeneQuant 1300 Spectrophotometer

Heizblock: Jumo tron
Heizplatte: IKAMAG®REO und IKAMAG®RCT
Infinite® 200 PRO NanoQuant

Ion OneTouch™ ES
Ion OneTouch™ Instrument
Konfokalmikroskop: Leica TCS SP5
Mikroapplikator

Mikrozentrifuge PerfectSpin 24 Plus

NanoDrop 2000 Micro-Volume UV-Vis
Spectrophotometer for Nucleic Acid and Protein

B. Braun Melsungen AG (Melsungen)
Schleicher & Schuell, WhatmanGmbH (Dassel)
Sarstedt AG & Co. (Nürnberg-Rommelsdorf)
Ratiolab GmbH (Dreieich)
Applied Biosystems®, Life Technologies GmbH (Darmstadt)
Nunc GmbH&Co. KG (Langenselbold)
Sarstedt AG & Co. (Nürnberg)
Carl Roth GmbH+Co. KG (Karlsruhe)
R. Langenbrinck, Labor- und Medizintechnik (Emmendingen)
Whatman GmbH (Dassel)
Sarstedt AG & Co. (Nürnberg)
Greiner BioOne GmbH (Kremsmünster)
Carl Roth GmbH+Co. KG (Karlsruhe)
Biohit Gruppe (Helsinki, Finnland)
nerbe plus kunststofftechnik für medizin und forschung (Winsen/Luhe)
Biozym Scientific GmbH (Hess.Oldendorf)
USA Scientific, Inc. (Orlando FL, USA)

Carl Roth GmbH+Co. KG (Karlsruhe)
Schott AG (Mainz)
Nunc GmbH&Co. KG (Langenselbold)
Merck Millipore Ltd. (Tulagreen, Carrigtwahill, Co. Cork, Irland)

Agilent Technologies, Inc. (Santa Clara, USA)
Merck KGaA (Darmstadt)
BD Bioscience (Heidelberg)
Heraeus Sepatech (Osterode/Harz)
Eppendorf AG (Hamburg)
Bio-Rad (München)
Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG (Berlin)
Keyence Deutschland GmbH (Frankfurt a.M.)
GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg)
JUMO GmbH & Co. KG (Fulda)
IKA®Werke GmbH&Co. KG (Staufen)
Tecan Group Ltd. (Männedorf, Schweiz)
Life technologies (Grand Island, USA)
Life technologies (Grand Island, USA)
Leica Microsystems GmbH (Wetzlar)
World Precisions Instruments (Sarasota, USA)
PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Thermo Scientific, NanoDrop products (Wilmington, USA)

Personal Genome Machine (PGM™) Sequencer	Life Technologies (GrandIsland, USA)
Präzisionswaage, 770-12	Kern & Sohn GmbH (Balingen-Frommern)
Qubit® 2.0 Fluorometer	Life Technologies GmbH (Darmstadt)
Schüttelapparat	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH (Burgwedel)
StepOnePlus™ System	Applied Biosystems®, Life Technologies GmbH (Darmstadt)
Sterilbank: Clean Air Thermo Scientific	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Thermomixer comfort, 1,5 ml	Eppendorf AG (Hamburg)
Ultrospec 3000 pro UV/Visible Spectrophotometer	GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg)
Vortex-Genie® 2	Carl Roth GmbH+Co. KG (Karlsruhe)

3.2 Methoden

3.2.1 Steriles Arbeiten und Sicherheitsmaßnahmen

Alle Laborarbeiten wurden je nach Bakterienspezies in Laborräumen mit den entsprechenden Schutzstufen und unter sterilen Bedingungen (Sterilwerkbank) durchgeführt. Die Isolierung der Gesamt-Ribonukleinsäure (RNA) wurde an einem speziellen RNA-Arbeitsplatz unter Benutzung von sterilem bzw. RNase-DNase-freiem Einmalmaterial durchgeführt. Nach Beendigung der Tätigkeiten erfolgten eine Desinfektion des Arbeitsplatzes und der Arbeitsmaterialien mit Ethanol (70 %) sowie eine Händedesinfektion.

3.2.2 Kultivierung der Bakterien

Ausstreichen von Bakterien

Die Bakterien wurden mit einer sterilen Platinöse auf geeignete Agarplatten ausgestrichen (gegebenenfalls wurden zur Erzeugung von Selektionsdruck Antibiotika zugesetzt) (Tab. 3) und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zur Herstellung eines anaeroben Milieus wurden die Agarplatten im Anaerobiertopf (Merck KGaA), in den eine mit 35 ml H₂O befeuchtete Anaerocult® A-Reagenzmischung (Merck KGaA) eingeschlossen wurde, bei 37 °C bebrütet.

Anlegen von Übernachtkulturen (ÜNK)

10 ml eines für das entsprechende Bakterium geeigneten Nährmediums (Tab. 3) wurden in einen 100 ml Erlenmeyerkolben pipettiert und mit einer Bakterienkolonie von einer Agarplatte beimpft. Bei Kulturen der Spezies *Enterococcus faecium* wurde das verwendete Nährmedium *Tryptic Soy Broth* (TSB) mit Glukose (0,25 %) (Merck KGaA) angereichert. Die Inkubation der Bakterienkulturen erfolgte über Nacht (ca. 16 Std., 37 °C) auf einem Schüttler bei 180 *rounds per minute* (rpm).

Anlegen von Glycerinkulturen

Zur Asservierung der Bakterien über mehrere Jahre in Glycerinkulturen (Endkonzentration: 30 % Glycerin) wurde in Mikro-Schraubröhrchen zu Glycerin die entsprechende Menge der Bakterien-ÜNK pipettiert. Die Glycerinkulturen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und sowohl bei -20 °C als auch bei -80 °C gelagert.

3.2.3 Bestimmung der Lebendzellzahlen

Zur Ermittlung der koloniebildenden Einheiten (KBE) von verschiedenen Bakterien wurde eine Bakterien-ÜNK im Verhältnis 1:20 verdünnt, indem 500 µl der ÜNK zu 9,5 ml des jeweiligen Mediums pipettiert wurden (Tab. 3). Die Flüssigkulturen inkubierten (37 °C, 180 rpm) bis sie eine optische Dichte (OD_{600}) von 1,0 erreicht hatten, wobei die Zeit je nach Bakterienstamm variierte. Die Messung der OD_{600} erfolgte in Halbmikroküvetten in einem Photometer (Ultrospec 3000 pro UV/Visible Spectrophotometer, GE Healthcare) bei 600 nm. Die bei einer OD_{600} von 1,0 eingestellten Bakterienlösungen wurden bei 8.000 rpm 3 Minuten zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Das Pellet wurde zum Waschen in 1 ml Natriumchlorid (NaCl) (0,9 %) (B. Braun Melsungen AG) aufgenommen und nach dem Vortexen erneut zentrifugiert (8.000 rpm, 3 Min.). Nachdem der Überstand abgenommen wurde, erfolgte wie zuvor beschrieben, ein weiterer Waschschrift. Das Bakterienpellet wurde in 1 ml NaCl resuspendiert und anschließend mit NaCl eine Verdünnungsreihe (1:10) hergestellt. Von der experimentell ermittelten und zum Auszählen geeigneten Verdünnung (10^{-6}) wurden jeweils 100 µl auf drei entsprechende Agarplatten mit einem sterilisierten Drigalskispatel ausplattiert. Die Bakterien wurden über Nacht (37 °C) bebrütet, anschließend die Bakterienkolonien ausgezählt und der arithmetische Mittelwert der KBE gebildet (Angabe in KBE/ml).

3.2.4 Vorbereitung der Pflanzenextrakte

Die Lagerung der Anthocyan-Extrakte (*Accent*, *Dakapo*, Heidelbeere) und des 3,2 % Rubini-Holunderbeer-Liquids erfolgte bei 4 °C, um einen Zerfall der Anthocyane, der mit steigender Temperatur zunimmt, zu vermeiden. Das Ansetzen der Extrakt-Stocklösungen mit dem jeweiligen Nährmedium (LB, BHI, TSB) (Tab. 3) für die OD_{600} -Messungen bzw. mit NaCl (0,9 %) für die Injektionsversuche erfolgte jeweils direkt vor dem Experiment. Für die photometrischen Messungen im Mikrotiterplatten-Gerät wurden jeweils 3,4 mg des pulverförmigen, charakteristisch süßlich-holzartig riechenden Beerenextrakts eingewogen, in 1 ml Nährmedium durch Vortexen gelöst. Zur Präparation des Flüssig-Extrakts wurde eine 1:50 Verdünnung mit einem für die

Bakterien geeigneten Nährmedium hergestellt (Tab. 3) (20 µl des Rubini-Holunderbeer-Liquid + 980 µl Nährmedium). Diese steril-filtrierte Stocklösungen (MILLEX®GV Filter Unit 0,22 µm, Durapore®PVDF Membrane, Merck Millipore Ltd.) hatten folgende molare Konzentrationen:

<i>Accent</i>	- 200 µM (bezogen auf Malvidin-3-Diglukosid)
<i>Dakapo</i>	- 660 µM (bezogen auf Malvidin-3-Glukosid)
Heidelbeere	- 224 µM (bezogen auf Cyanidin-3-Glukosid)
Holunderbeere	- 1.082 µM (bezogen auf Cyanidin-3-Sambubosid).

Die Berechnung der molaren Konzentration beruhte auf der Mengenangabe des quantitativ am häufigsten vorkommenden Anthocyans im jeweiligen Extrakt (Tab. 4; Anhang A2).

3.2.5 Vorbereitung der Insektenpeptide

Die antimikrobiellen Peptide (AMP) wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO) (25 %) vorgelöst. Cys-haltige AMP lösten sich in Dimethylformamid (DMF) (25 %), wobei durch Auffüllen mit destilliertem H₂O eine Konzentration der AMP-Stocklösung von 10 mg/ml in 5 % DMSO bzw. DMF eingestellt wurde. Diese DMSO- oder DMF-Konzentrationen hatten, wie experimentell ermittelt, keine Auswirkungen auf das Bakterienwachstum.

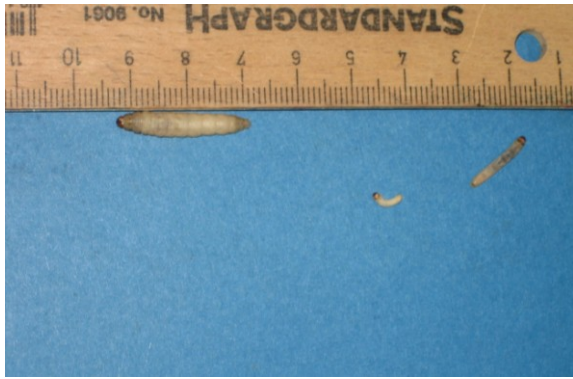
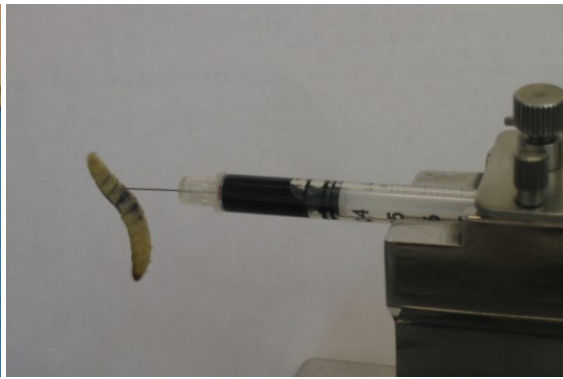
3.2.6 Messung der optischen Dichte

Kontinuierliche photometrische Messungen ermöglicht das multifunktionale Mikrotiterplatten-Gerät Infinite® 200 PRO NanoQuant der Firma Tecan (Instructions for Use for infinite® 200, 2008). In durchsichtigen Mikrotiterplatten mit Deckel (96 MicroWell™ Plates und Standard Lids, Nunc GmbH & Co. KG) können mit dem Gerät im Hochdurchsatzverfahren Wachstumskurven von Bakterien erzeugt werden. Bei einer Temperatur von 37 °C (Temperaturminimum: 36,0 °C; Temperaturmaximum: 38,0 °C) wurde über einen Zeitraum von 24 Stunden in 20-Minuten-Intervallen die OD₆₀₀ ermittelt. Die verwendete Wellenlänge betrug 600 nm und hatte eine Bandbreite von 9 nm. Die multiplen Messungen erfolgten pro Messzeitpunkt im sogenannten „FilledSquare“-Typ an vier verschiedenen Stellen in jedem mit 200 µl gefüllten Well. Vor jeder Messung wurden die Bakterienkulturen orbital für 7,5 Minuten mit einer Amplitude von 3 mm und einer Frequenz von 44,3 rpm geschüttelt. Für die Analysen wurde zunächst das Bakterien-Nährmedium in den Wells vorgelegt, 10 µl einer ÜNK (experimentell ermittelt geeignetes Inokulum für diese Ansätze) und die verschiedenen Mengen an Anthocyan-haltigen Stocklösungen, AMP-Stocklösungen bzw. andere Testsubstanzen hinzugefügt.

3.2.7 Umgang und Infektion von Larven der *G. mellonella*

Im Folgenden wird der Ablauf einer Infektion sowie die Verabreichung des Anthocyan-haltigen Traubenextrakts *Dakapo*, exemplarisch für alle getesteten AMP, beschrieben. Eine über Nacht angewachsene Bakterienkultur wurde 1:20 mit entsprechendem Nährmedium verdünnt und erneut bei 37 °C inkubiert. Das anschließend eingesetzte Bakterienvolumen wurde berechnet, so dass es einer OD₆₀₀ von 1,0 entsprach. Die Bakterienkultur wurde zweimal mit NaCl (0,9 %) gewaschen und das gereinigte Bakterienpellet in 1 ml NaCl aufgenommen. An jedem Injektionsversuchstag wurde die injizierte Bakteriendosis (KBE) erneut bestimmt (Kap. 3.2.3). In Abhängigkeit von der Bakterienspezies wurde eine geeignete Injektionsdosis mittels eines Dosis-Wirkungs-Versuches ermittelt (Kap. 4.2.1). Die Injektionssuspension wurde in eine sterile Feindosierungsspritze (Omnican®-F, 0,01 mL-1 mL, 0,30x12 mm, B. Braun Melsungen AG) aufgezogen, diese in den Mikroapplikator (World Precisions Instruments, Inc.) eingespannt und die Kanüle in geeignete Position gedreht. Nachdem die Larve mit einer weichen, stumpfen Pinzette gegriffen wurde, erfolgte die Injektion zwischen das letzte Beinpaar der Larve durch Betätigung der Dosierungsschraube. Eine Umdrehung entspricht der gewünschten Injektionsdosis von 10 µl. Nach kurzem Warten wurde die Larve in eine Petrischale (94/15 mm) gesetzt, wobei in einer Petrischale jeweils zehn infizierte Larven nach Zugabe von etwas Futter bei 37 °C inkubiert wurden.

Im *in vivo*-Versuchsmodell wurde die Wirkung von potenziell antimikrobiellen Substanzen getestet. Berechnungsgrundlage für die Konzentration der injizierten *Dakapo*-Lösung war die verwendete Konzentration in den *in vitro*-Versuchen (Kap. 3.2.4), die auf das ermittelte Larvendurchschnittsgewicht (ca. 150 mg; Länge: ca. 2 cm) bezogen wurde (Abb. 10A). Die in die Larve injizierte *Dakapo*-Endkonzentration betrug 30 µM bzw. 153 µg/Larve (Konzentration der steriltriierten Stocklösung vor Mischung mit Bakterien: 5.940 µM) (Abb. 10B). Beim Infektionsversuch wurden für die Behandlungsgruppe Bakterien und Testsubstanzen kurz vor der Injektion zusammengefügt und jeder Larve eine Injektionsdosis von 10 µl verabreicht. Die in die Larve injizierte Endkonzentration von 30 µM *Dakapo* (bzw. 153 µg/Larve) wurde von den Larven metabolisiert, denn nach der Injektion färbten sich diese zwar blau, nahmen aber schon nach einigen Stunden ihre gewöhnliche Farbe wieder an (Abb. 10). Die eingesetzte Konzentration der Anthocyan-haltigen Stocklösung konnte jedoch nicht beliebig erhöht werden, da die Larven bei zu hohen Endkonzentrationen abstarben.

A) Verschiedene Larvenstadien von *G. mellonella*.B) Injektion des Traubenextraktes *Dakapo* + Bakterien.Abb. 10: Die Große Wachsmotte *G. mellonella*

Als Kontrollgruppen dienten bei den Versuchen Larven, in die NaCl (0,9 %) oder die zu testende Substanz injiziert wurden sowie eine Kontrollgruppe ohne Injektion, um die Effekte durch die Inkubationsbedingungen zu kontrollieren. Bei jedem Versuchsansatz wurden mindestens 10 Larven behandelt und jeder Versuch wurde mindestens dreimal wiederholt. Nach der Injektion wurden täglich über einen Zeitraum von 3-7 Tagen je nach Bakterienstamm und Infektionsdosis die überlebenden Larven bestimmt. Dabei galten die Larven als tot, wenn sie nach Berührung mit einer weichen Pinzette keine Regung mehr zeigten. Die schwarze Färbung der toten Larven ist auf die Melanisierung, eine Immunreaktion, zurückzuführen (Kap. 1.5). Nach Beendigung der Versuche wurden die Larven über Nacht bei -20 °C eingefroren und im Autoklavierabfall entsorgt.

3.2.8 Genexpressionsanalyse

3.2.8.1 RNA-Isolierung

Zur Untersuchung der divergierenden Effekte (Wachstumsinhibition bzw. -induktion) von *Dakapo* auf das Wachstum von verschiedenen Bakterien wurde für die Genexpressionsanalyse RNA aus Bakterien-Kulturen isoliert. Jeweils eine mit und ohne *Dakapo* (77 µM) angewachsenen ÜNK von *L. monocytogenes* EGD-e Wildtyp (Wt) bzw. EAHEC (ST3305, Gießen) wurde verdünnt (1:20), über einen Zeitraum von drei Stunden 30 Minuten (*L. monocytogenes*) bzw. drei Stunden (EAHEC) auf dem Schüttler bei 37 °C kultiviert und die OD₆₀₀ bestimmt. Nach diesen Zeiträumen war der *Dakapo*-Effekt am deutlichsten ausgeprägt. Zu jeweils 1 ml RNeasy Protect Bacteria Reagent (Qiagen) wurden 500 µl von den Bakterienkulturen gegeben, gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur (RT) stehen gelassen. Anschließend wurde nach Zentrifugation (8.000 rpm, 10 Min.) der Überstand abgenommen, die gewonnenen Bakterienpellets in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Zur Isolierung der Gesamt-RNA bei RT wurde das miRNeasy Mini Kit (Qiagen) verwendet, wobei bei diesem Verfahren die selektive Bindungseigenschaft einer Silicagel-Membran mit der Mikrosäulenzentrifugationstechnik kombiniert wird. Die aufgetauten Bakterienpellets wurden in 200 µl SET-Puffer [50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 30 mM Tris-Salzsäure pH 7,0, 10 % Natriumlaurylsulfat (SDS)] resuspendiert, zentrifugiert (3 Min., 13.200 rpm, RT) und der Überstand verworfen. Nach Zugabe von sterilfiltriertem Lysozym (50 mg/ml; Merck KGaA), gelöst in 83 µl 50 mM Tris (pH 6,5), wurde ein Enzymmix bestehend aus 2 µl SUPERase (20 u/µl; Ambion®), 5 µl Mutanolysin (5 u/µl; Sigma-Aldrich) und 10 µl Proteinase K (20 mg/ml; Ambion®) hinzugefügt und im Thermomixer (37 °C, 350 rpm, 45 Min.) inkubiert. Nach Zugabe von 600 µl QIAzol lysis reagent wurde für 5 Minuten inkubiert, anschließend 140 µl Chloroform (Merck KGaA) dazu pipettiert und erneut 2-3 Minuten gewartet. Zur Phasentrennung wurde in einer Kühlzentrifuge für 15 Minuten zentrifugiert (4 °C, 13.200 rpm), so dass sich die obere, wässrige Phase in ein neues Eppi transferieren ließ. Durch die Zugabe des 1,5-fachen Volumens an Ethanol (100 %) (Sigma-Aldrich) und anschließendem Überführen der Probe auf eine RNeasy Mini spin column in ein 2 ml Collection Tube wurden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den RNA-Molekülen und Hydroxylgruppen-Silcat-Atomen ausgebildet und die RNA selektiv an die Silicagel-Membran gebunden. Nach dem darauffolgenden Zentrifugationsschritt für 15 Sekunden bei 8.000 rcf (*relative centrifugal force*) wurde der Durchfluss verworfen. Einem Waschschrift mit 350 µl RWT Buffer und Zentrifugation wie zuletzt beschrieben, folgte für 40 Minuten eine Behandlung der gebundenen RNA mit einem Inkubationsmix bestehend aus 105 µl RDD Buffer + 15 µl DNase-Stocklösung zur Degradierung eventuell vorhandener genomischer Desoxyribonukleinsäure (DNA). Mehrfache Zentrifugationsschritte mit Waschpufferlösungen dienten zur Entfernung von Proteinen, Salzen und anderen zellulären Bestandteilen von der Membran. Dazu wurde 350 µl RWT Buffer auf die Säule gegeben, zentrifugiert (15 Sekunden, 8.000 rcf) und der Durchfluss entsorgt. Dieser Schritt wurde mit 500 µl RPE wiederholt und nach Zugabe von 500 µl RPE 2 Minuten zentrifugiert (8.000 rcf). Nach Trockenzentrifugation (13.200 rpm, 1 Min.) wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Eppi transferiert und die gereinigte RNA mit 40 µl RNase-freiem H₂O von der Säulenmembran durch Zentrifugation (1 Min., 8.000 rcf) eluiert. Die empfindliche RNA wurde bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gekühlt oder bei -80 °C gelagert.

3.2.8.2 Bestimmung der RNA-Konzentration und RNA-Reinheit

Die Konzentrationsmessung der RNA erfolgte mit dem NanoDrop 2000 Micro-Volume UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific) und mit dem Qubit® 2.0 Fluorometer

(Life Technologies GmbH). Trotz thermostabiler Eigenschaften kann eine Degradation der RNA durch ubiquitär vorkommende RNase-Enzyme relativ schnell stattfinden. Die Reinheit der isolierten RNA wurde mittels Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) durch eine standardisierte Prozedur der RNA-Qualitätskontrolle abgeschätzt, die eine Kalkulation der sogenannten RNA Integritätsnummer (RIN) mithilfe eines Software Algorithmus ermöglicht. Auf Basis einer mikrofluiden Technologie werden mittels automatisierter, elektrophoretischer Separation kleinste Mengen an RNA Proben in gelgefüllten Kanälen eines Chips entsprechend des molekularen Gewichts aufgetrennt und mit einer Laser-induzierten Fluoreszenz detektiert. Visualisiert wird das Ergebnis als Elektropherogramm, da die gemessene Fluoreszenz mit der Menge an RNA einer bestimmten Größe korreliert. Der RIN wird in der Größenordnung zwischen 1 (völlig degradiert) und 10 (intakt) angegeben. Dabei weist eine Abnahme der Signalintensität im Bereich der ribosomalen Banden (16S- und 23S-rRNA bei Prokaryonten) kombiniert mit einer Zunahme an kürzeren RNA-Fragmenten auf eine vermehrte RNA-Degradation hin (Schroeder et al., 2006).

3.2.8.3 *Next generation sequencing* (NGS) mit dem Ion Personal Genome Machine® (PGM™) System

Zur Analyse der Gesamtheit aller in einer Zelle hergestellten RNA-Moleküle musste nach Isolierung der Gesamt-RNA zunächst die rRNA (ribosomale RNA) mithilfe des Ribo-Zero™ Magnetic Kit (Bacteria) (Epicentre Biotechnologies) eliminiert werden. Dieses Präparations-Kit entfernt >99 % der 16S und 23S rRNA bzw. >85 % der 5S rRNA der bakteriellen Gesamt-RNA. Typischerweise werden nur 3-10 % der eingesetzten RNA nach rRNA-Eliminierung und der säulenbasierten Aufreinigung erhalten. Die Bestimmung der Qualität von der rRNA-abgereicherten RNA erfolgte mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer auf einem Agilent RNA6000 Nano Chip (Agilent Technologies). Die Umwandlung des 5'-Triphosphat-Endes in ein monophosphoriliertes Ende wurde nach Angaben des Herstellers durch eine Tobacco Acid Pyrophosphatase ermöglicht (Epicentre Biotechnologies). Für die Fragmentierung und Umschreibung der mRNA (*messenger* RNA) in eine repräsentative, komplementäre cDNA (*complementary DNA*) wurden die Proben mit dem Ion Total RNA-Seq Kit v2 (Katalog-Nr.: 4475936, Rev. B, 09.05.12, Life Technologies) nach Angaben des Herstellers verarbeitet. Die Größenverteilung nach der Fragmentierung wurde mit dem Agilent RNA 6000 Pico Kit überprüft (Agilent Technologies). Die durch reverse Transkription erzeugte cDNA wurde anschließend aufbereitet, amplifiziert und erneut aufgereinigt. Zur Bestimmung der Konzentration und Menge der synthetisierten cDNA wurde das Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies) verwendet

und eine Emulsions-PCR zur Amplifizierung im Ion OneTouch™ Instrument nach Verarbeitung mit dem Ion One Touch™ 200 Template Kit v2 (Katalog-Nr.: 4478316, Rev. A, Life Technologies) angeschlossen. Die Methode amplifiziert die DNA innerhalb von Wassertropfen in einer Öllösung, wobei jeder Tropfen ein einzelnes DNA-Template enthält, an das sich ein Primer-überzogenes Magnetkügelchen anlagert. Die automatisierte Anreicherung im Ion OneTouch™ ES mittels Glasperlentechnik (*magnetic bead technology*) diente der Isolation von Template-positiven Ion-Sphere™-Partikeln, mit denen der Ionen-Halbleiterchip beladen wurde. Die Sequenzierung erfolgte mit dem PGM™ Sequencer (Ion Torrent™, Life Technologies) nach Bearbeitung der Proben mit dem Ion PGM 200 Sequencing Kit (Rev. D, 08.06.12, Life Technologies). Das Prinzip beruht auf der Verknüpfung einer Halbleitertechnologie mit einer einfachen Sequenzierungschemie. Die Sequenzierung erfolgt dabei beim Verknüpfen eines zum DNA-Fragment komplementären Stranges. Die Vertiefungen des Chips wurden zunächst mit je einem vorbereiteten Ion-Sphere™-Partikel gleichmäßig beladen. Anschließend wurden Lösungen der vier Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) nacheinander über den Chip gespült. Beim Einbau einer Base in den neu entstehenden Strang kommt es zur Freisetzung eines Protons, das den pH-Wert der Lösung verändert und durch einen Ionensensor detektiert wird (Prinzip eines pH-Meters). Ion Torrent™ benutzt einen Array von Mikro-*Wells* um den biologischen Prozess des Baseneinbaus zu initiieren. Jedes *Well* beinhaltet ein unterschiedliches DNA-Template. Unter den *Wells* befindet sich eine Ionen-sensitive Schicht, worunter der passende Ionensensor eingebaut ist. Durch die direkte Transformation der chemischen in eine digitale Information wird eine schnelle Sequenzierung ermöglicht. Die technischen Daten zur Sequenzierung befinden sich im Anhang A3.

3.2.8.4 cDNA-Synthese

Die Analyse der Transkripte durch Polymerase-Ketten-Reaktion (*Polymerase-chain-reaction*) (PCR) macht die selektive Umschreibung der mRNA in eine zur Basenabfolge der mRNA komplementäre DNA (cDNA) erforderlich. Diese Umwandlung wird von reversen Transkriptasen durch Verwendung von Hexamer- und Nonamer-Oligonukleotiden katalysiert. Je cDNA-Syntheseansatz wurden zu 3 µg isolierter RNA jeweils 1 µl unspezifische Hexamer(5'-NNN NNN-3') und Nonamer(5'-NNN NNN NNN NNN-3')-Primer gegeben, mit RNase-freiem H₂O auf 12 µl aufgefüllt und bei 70 °C für 5 Minuten erhitzt. Nach 10 Minuten bei RT wurden je Ansatz die in Tab. 6 aufgeführten Komponenten zugefügt. Die Umschreibung von mRNA in cDNA erfolgte

im Heizblock durch enzymatische Umsetzung mit dem Enzym SuperScript® II Reverse Transcriptase bei 42 °C (90 Min.).

Tab. 6: Einfacher Ansatz für die cDNA-Synthese

Reagenzvolumen: 20,0 µl		
3 µg RNA		x µl
RNase-freies H₂O		x µl
Primer: Hexamer 5'-NNN NNN-3' (100 pmol/µl)	(Eurofins MWG Operon)	1,0 µl
Nonamer 5'-NNN NNN NNN-3 (100 pmol/µl)	(Eurofins MWG Operon)	1,0 µl
0,1 M DTT	(Invitrogen™)	2,0 µl
10 mM dNTP Mix	(Thermo Fisher Scientific Bioscience)	1,0 µl
SuperScript® II Reverse Transcriptase	(Invitrogen™)	1,0 µl
5x First Strand Buffer	(Invitrogen™)	4,0 µl

Anschließend wurde die cDNA mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und die Konzentration mit dem NanoDrop (ssDNA-33) bestimmt. Die Lagerungstemperatur für die cDNA beträgt -20 °C.

3.2.8.5 Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Zur Verifizierung der Transkriptomanalysedaten wurde von selektierten Genen eine Primereffizienz-korrigierte, relative Quantifizierung mittels quantitativer Real-Time-PCR (qRT-PCR) mit dem QuantiTec® SYBR®Green PCR Kit (Qiagen) durchgeführt. Die qRT-PCR dient dazu, einen beliebigen, genau definierten kurzen Teil eines DNA-Stranges zu vervielfachen. Die Amplifikation erfolgte in drei Schritten, wobei der Reaktionsansatz zunächst zur Aufschmelzung der doppelsträngigen DNA auf 95 °C erhitzt wurde (*Denaturation*). Dann banden die für jedes untersuchte Gen selektierten Primer bei einer Primer-spezifischen Temperatur an die Einzelstränge, wobei in diesem Fall 55 °C gewählt wurde (*Annealing*). Anschließend wurden die komplementären Stränge durch die hitzestabile Polymerase bei 72 °C synthetisiert (*Extension*) und es kam zu einer schrittweisen, exponentiellen Vermehrung der DNA. Die Quantifizierung der PCR-Produkte erfolgte in der exponentiellen Phase der PCR am Ende der Elongation durch den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green, der an die doppelsträngige DNA band und ein Fluoreszenzsignal erzeugte. Pro Ansatz wurden 22,5 µl Mastermix (Tab. 7), cDNA (Endkonzentration: 2,5 ng/µl) eingesetzt und mit H₂O auf ein Endvolumen von 25 µl aufgefüllt. Als Positiv-Kontrollen diente chromosomale DNA von *L. monocytogenes* EGD-e bzw. EAHEC und als Negativ-Kontrolle H₂O.

Tab. 7: Mastermix, einfacher Ansatz für die qRT-PCR

Reagenzvolumen: 22,5 µl	
H ₂ O	8,0 µl
Forward Primer [10 pmol/µl] (Eurofins MWG Operon)	1,0 µl
Reverse Primer [10 pmol/µl] (Eurofins MWG Operon)	1,0 µl
QuantiTec® SYBR®Green PCR Kit (Qiagen)	12,5 µl

Die verwendeten Primersequenzen (Tab. 8) wurden mit dem Programm Primer3 (v. 0.4.0) ausgewählt (Kriterien: Primerlänge optimal 20 bp; Produktlänge 120-150 bp; CG-Gehalt optimal 40 %) und von der Firma Eurofins MWG Operon bezogen.

Die qRT-PCR wurde mittels des StepOnePlus™ Systems (Applied Biosystems®, Life Technologies GmbH) durchgeführt. Die Primeramplifikationseffizienz (E) wurde für jeden Primer über eine probenindividuelle cDNA-Verdünnungsreihe und einer daraus erstellten Standardkurve errechnet, wobei zur Bestimmung der *cycle threshold* (Ct)-Werte die Analysesoftware des StepOnePlus v2.2.2 verwendet wurde. *SigB* (*Imo0895*) (kodiert für *RNA polymerase sigma factor* bei *L. monocytogenes*) bzw. *gpsA* (kodiert für *Glycerol-3-phosphat-dehydrogenase* bei EAHEC) dienten als Referenzgene, da deren Expressionen keine Veränderung nach Behandlung mit *Dakapo* zeigten. Zur Ermittlung der relativen mRNA-Konzentration eines Genes wurde das $\Delta\Delta$ -Ct-Berechnungsmodell nach Pfaffl (2001) herangezogen:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{Referenzgen}}$$

$$\Delta\Delta Ct = Ct_{\text{Dakapo-Behandlung}} - Ct_{\text{unbehandelt}}$$

$$E = 10^{[-1/\text{Steigung}]}$$

$$\text{Ratio} = (E_{\text{Zielgen}})^{\Delta Ct_{\text{Zielgen (Kontrolle-Behandlung)}}} / (E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta Ct_{\text{Referenzgen (Kontrolle-Behandlung)}}}$$

Die relative mRNA-Konzentration wurde durch den Vergleich der mRNA-Konzentration des entsprechenden Zielgens in Bezug zur mRNA-Konzentration von *SigB* bzw. *gpsA* berechnet und die mRNA-Konzentration der unbehandelten Probe zur Veranschaulichung dabei auf 1,0 gesetzt.

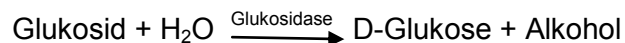
Tab. 8: Verwendete Primer für die qRT-PCR

Gen	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')	P* (bp)	E** (%)	Referenz
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD-e					
<i>Imo0018</i>	CAAAATGGAAGATGGCGACT	TAGTGTTCGAAAACGTTGC	139	96,20	diese Arbeit
<i>Imo0027</i>	GAACCAGCGATTACGGTGT	GACCGAAGATTCCAAGTCCA	139	98,47	diese Arbeit
<i>Imo0319</i>	TTACTGACGGTCCAACACCA	CACCATTTGGGAAGATACGG	147	96,83	diese Arbeit
<i>Imo0536</i>	TGCTAACCTGGAAAAGTCG	GCATTGCATCCGTCATGTAG	122	93,35	diese Arbeit
<i>Imo0880</i>	AACAAGGGTAGACGGTGTCG	TGCGTCCAAATGTAAACCA	122	106,93	diese Arbeit
<i>Imo0995</i>	TCCAATTGCTTGATCCTGAA	CAACGAAGAGAGCAATGCAA	123	96,90	diese Arbeit
<i>SigB</i>	GCGCCGAATCAAAGAGTTAG	TTTCCCATTTCCATTGCTTC	147	88,42	diese Arbeit
EAHEC (ST3305, Gießen)					
<i>bfr</i>	TCCGACCTGCGATTAGAACT	AGCTCAGTTTCGAGCCAGTC	149	91,97	diese Arbeit
<i>cir</i>	TGACGAACGAAGGGGATAAC	AAATCATTGTGGCGGAAGAC	124	105,21	diese Arbeit
<i>entA</i>	TGATCAAGCGTTCACTCAGG	CATTGATCAGCACGTCCAGT	131	89,10	diese Arbeit
<i>entE</i>	TGAGATTGGCTGTCAGTTGC	GTCCGGACACATTGGGTAAC	121	90,70	diese Arbeit
<i>entF</i>	TGAAGGCAACTACGCTGAT	CACGTTCTGGGACTCATACCT	122	95,82	diese Arbeit
<i>eptA</i>	TCCCTAATACCGCATCTTGC	ATGATATCCAGCACGCCTTC	124	87,00	diese Arbeit
<i>fecA</i>	TGGGGCTGTTCTGATTAAC	CGTTAGCGTACCCAGATCGT	131	88,55	diese Arbeit
<i>fecC</i>	AGGATGTCTGGCAGCTCTTG	AGGTTCACTCCCAGCGTATG	121	105,54	diese Arbeit
<i>fepA</i>	TTGTATGGCAACCTCGACAA	GCACCACGCCGTTAATATCT	142	90,19	diese Arbeit
<i>fhuF</i>	ATTAGATGTGTCGCCGGAAC	GCCTGGCTGATTAACGTTTC	141	100,10	diese Arbeit
<i>ftnA</i>	GTTGAATCTCCGTTTGCTGA	CTGATTGGTCATTGCAGCA	120	99,26	diese Arbeit
<i>fyuA</i>	TGACCGATGACTGGAGAGTG	CGGGTGCCAAGTTCATAGTT	136	89,00	diese Arbeit
<i>gpsA</i>	AGGGCATGGATGTACAAAGC	TCCTCGGTTATTGGCATTTC	121	100,86	diese Arbeit
<i>iucA</i>	GATTTGCAGACGGGTCACCT	CTGCCATTTGTGGATGTTTG	142	85,33	diese Arbeit
<i>tonB</i>	TGACATCAAGTACGGCAACG	TTTAACCTGCCCTTCAATGC	134	99,79	diese Arbeit

*P=Produktgröße; **E=ermittelte Primeramplifikationseffizienz (Pfaffl, 2004)

3.2.9 Nachweis der Beta-Glukosidase-Aktivität

Der Nachweis der β -Glukosidase-Aktivität in *L. monocytogenes* EGD-e nach Zugabe von *Dakapo* erfolgte durch Umsetzung des Substrates 4-Nitrophenyl- β -D-Glukopyranosid, wobei β -Glukosidasen folgende Reaktion katalysieren (Darbouche, 2012; Darbouche et al., 1996):



Die Bakterien wurden wie in Kap. 3.2.8 (Transkriptomanalyse) beschrieben mit und ohne *Dakapo* (77 μ M) angezüchtet. Jeweils 1 ml dieser Kulturen wurde zentrifugiert (3 Min., 8.000 rpm), der Überstand verworfen und das Pellet in 500 μ l BHI-Nährmedium gelöst. 60 mg 4-Nitrophenyl- β -D-Glukopyranosid (Sigma-Aldrich) wurden in 10 ml 0,1 M Natrium-Phosphatpuffer (pH: 7,0) (Sigma-Aldrich) gelöst und diese Lösung im Verhältnis 1:5 mit steriler Pepton-Lösung (0,1 % Pepton; 0,05 % NaCl) gemischt. Davon wurden jeweils 500 μ l auf die gelösten Bakterienpellets pipettiert und auf dem Heizblock inkubiert (37 °C, 30 Min.). Nach Abzentrifugation (13.200 rpm, 5 Min.) war die durch *Dakapo* spezifische, bräunliche Farbe eliminiert und die OD₄₂₀

konnte gegen den entsprechenden Leerwert (500 ml BHI+500 µl Peptonlösung) gemessen werden. Als Positivkontrolle diente ein Ansatz mit 2,25 ng/µl β-Glukosidase (aus *Caldocellum saccharolyticum*, Sigma-Aldrich).

3.2.10 Umgang mit Hämozyten aus *G. mellonella*

3.2.10.1 Isolierung der Hämozyten

Die Hämolymphe konnte mittels eines ventralen Einstichs mit einer Kanüle und anschließend Ausdrücken der Larven gewonnen werden. Die Hämozyten wurden kultiviert, so dass die Untersuchung bakterieller Infektionen und Reaktionen des Immunsystems *in vitro* möglich wurde. Das zu gewinnende Hämolymphevolumen aus einer Larve variierte in Abhängigkeit von der Größe und dem Zustand der Larven und betrug ca. 5-20 µl. Das Zytoskelett, der Zellkern der Hämozyten und die infizierten Bakterien wurden durch Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen sichtbar gemacht. Zur Vorbereitung eines für die Hämozyten geeigneten Nährmediums wurden zu Grace's Insect Medium (GIM) (pH-Wert 6,6) (Sigma-Aldrich) Gentamycin Sulfate (Merck KGaA) und 1 µg/ml N-Phenylthiourea (≥98 %, Sigma-Aldrich) (zur Verhinderung einer Melanisierung) hinzugefügt. In *Wells* einer 24-*Well*-Zellkulturplatte wurde jeweils ein steriles Deckgläschen mit einer spitzen Pinzette gelegt. Mehrere Larven im fortgeschrittenen Larvenstadium wurden zur Desinfektion ihrer Oberfläche und Vermeidung einer Verunreinigung der Hämolymphe mit destilliertem H₂O, anschließend mit Ethanol (70 %) in kleinen Petrischalen gewaschen und kurz getrocknet. Die Larven wurden mit einer Einmal-Kanüle angestochen und die gewonnene Hämolymphe auf hydrophoben Parafilm getropft. Ca. 30 µl Hämolymphe wurden in die Eppis mit je 1 ml vorbereitetem, vortemperiertem (30 °C) GIM gegeben, vorsichtig durch Drehen mit der Nährlösung vermischt und in je ein *Well* der Zellkulturplatte pipettiert. Die Hämozyten inkubierten über Nacht (oder länger) bei 30 °C.

3.2.10.2 Infektion der Hämozyten

Für die Infektion wurde eine Bakterien-ÜNK 1:20 verdünnt, auf eine OD₆₀₀ von 1,0 eingestellt und die KBE bestimmt (Kap. 3.2.3). In einem Vorversuch wurde in Mikrotiterplatten getestet, dass N-Phenylthiourea das Wachstum der Bakterien nicht beeinflusst, verbrauchtes GIM hingegen, in dem die Hämozyten über Nacht angewachsen sind, eine drastische Wachstumshemmung hervorruft. Daher wurden zu 900 µl frischem GIM mit 1 µg/ml N-Phenylthiourea, 100 µl der mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) [NaCl 140 mM/l; Kaliumchlorid 2,7 mM/l; KH₂PO₄ 1,8 mM/l; Na₂HPO₄·2 H₂O 10 mM/l; pH=7,4] gewaschenen Bakterienkultur hinzugefügt

(Kap. 3.2.3). Die über Nacht kultivierten Hämozyten wurden dreimal mit PBS gewaschen und je *Well* mit 1 ml der verdünnten Bakteriensuspension infiziert. Die Inkubation mit den Bakterien erfolgte bei 37 °C für vier Stunden. Danach wurden die Deckgläschen in PBS getaucht und die Hämozyten und Bakterien mit 3,7 %-igem Formaldehyd (Formaldehyd 16 %, mit PBS verdünnt) auf dem Deckgläschen für 10 Minuten fixiert. Permeabilisiert wurde nach dreimaligem Waschen in PBS mit Triton (0,2 %, mit PBS verdünnt) für 10 Minuten. Danach wurden die Deckgläschen erneut dreimal mit PBS gewaschen.

3.2.10.3 Fluoreszenzfärbung der Hämozyten

Zum Anfärben des Zytoskeletts wurde der Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor® 647 *phalloidin* (300 units, Invitrogen™) verwendet. Die Färbung erfolgte in einer Feuchtkammer (leere Spitzenbox, befeuchtetes Papier, Parafilm). Je bewachsenem Deckgläschen wurde 0,5 µl Alexa Fluor® 647 *phalloidin* in 19,5 µl PBS verdünnt (0,1 u/Deckgläschen), auf Parafilm pipettiert, das Deckgläschen mit der bewachsenen Seite nach unten darauf gelegt und lichtgeschützt inkubiert (37 °C, 60 Min.). Anschließend erfolgten erneut drei Reinigungsschritte mit PBS. Auf Objektträgern wurde je 3 µl ProLong® Gold mit integriertem 4',6-Diamino-2-phenylindol (DAPI)-Fluoreszenz-Farbstoff (ProLong® Gold antifade reagent with DAPI, Invitrogen™) vorgelegt, die Deckgläschen darauf gelegt und lichtgeschützt trocknen gelassen. Endgültig befestigt wurden die Deckgläschen mithilfe einer dünn aufgetragenen Nagellackschicht. Die Lagerung der Objektträger erfolgte lichtgeschützt bei 4 °C.

3.2.11 Fluoreszenzmikroskopie

Die Hämozyten wurden mithilfe des Fluoreszenzmikroskops (Biozero, BZ-8000 Fluorescence Microscope, Keyence Deutschland GmbH) unter Verwendung eines speziellen, Benzylbenzoat enthaltenden Immersionsöls (Merck KGaA) mikroskopisch untersucht. Unter Durchlicht und mit den Filtern DAPI-BP (Excitation 360/40, Absorption 460/50, *dichroic wavelength* 400 nm) (für die Bakterien und den Zellkern der Hämozyten) und TexasRed (Excitation 560/40, Absorption 630/60, *dichroic wavelength* 595 nm) (für das Zytoskelett der Hämozyten) konnten die Präparate betrachtet werden. Zur Auswertung der Bilder wurde die Software BZ-Image Analyzer Image analysis application BZ-H1AE System version 3.54 angewandt. Eine aufwendigere Beobachtung ermöglichte das Konfokalmikroskop (Leica TCS SP5, Leica Microsystems GmbH).

3.2.12 Untersuchung des *viable-but-not-culturable* (VBNC)-Zustandes

Zur Untersuchung, ob sich der Bakterienstamm EAHEC (2011) in der Umwelt in einem *viable-but-not-culturable* (VBNC)-Zustand befindet, wurde der Stamm EAHEC (ST3305, Gießen) in Fließgewässer (FL), Leitungswasser (LW) und Oberflächenwasser (OW) (Gewässer aus Hessen, Deutschland) über einen Zeitraum von zwei Jahren (720 Tagen) untersucht. Die frisch gewonnenen Gewässer wurden autoklaviert (20 Min., 121 °C, 2 bar), um das Wachstum anderer Mikroorganismen zu unterbinden. Jeweils eine ÜNK von EAHEC (ST3305, Gießen) und *E. coli* ECO1080 K12 wurden in LB 1:20 verdünnt und über einen Zeitraum von sechs Stunden anwachsen gelassen. 7 ml von diesen logarithmisch gewachsenen Bakterienkulturen wurden zweimal mit PBS, wie im Kap. 3.2.3 beschrieben, gewaschen und die KBE bestimmt. 1 ml dieser Bakterienkulturen wurde jeweils in 49 ml FL, LW und OW verdünnt und die Ansätze sowohl bei 4 °C als auch bei RT (ca. 20 °C) stehen gelassen. Einmal wöchentlich wurden die Wasserproben durch kurzes Schütteln gemixt. In gewissen Zeitabständen (ca. alle 8 Wochen) wurden die KBE, wie in Kap. 3.2.3 beschrieben, bestimmt und mit dem Tecan-Gerät Wachstumskurven mit und ohne Zugabe von *Dakapo* erstellt (Kap. 3.2.6). Im 200 µl *Well* der Mikrotiterplatten wurden dabei je 100 µl der sich in Wasser befindenden Bakterien zu 100 µl zweifach-konzentriertem LB-Flüssignährmedium pipettiert.

3.2.12.1 Untersuchung der Resistenzstabilität

Die EAHEC-Kulturen in den verschiedenen Gewässern wurden sowohl auf LB-Agarplatten als auch auf LB-Agarplatten mit 2 µg/ml Cefotaxim (Fresenius Kabi GmbH) ausplattiert, um zu testen, ob die Bakterien ohne Selektionsdruck die Resistenzeigenschaft verlieren. Ebenso wurden einzelne Kolonien gepickt und auf beiden Agarplatten ausgestrichen.

3.2.12.2 Live-dead-staining

Mit dem Zwei-Farben-Fluoreszenz-Assay LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit for microscopy and quantitative assays (Invitrogen™), lässt sich quantitativ die Überlebensfähigkeit verschiedenster Bakteriengattungen feststellen. Die Bestimmung der Lebendzellzahlen erfasst nur die kultivierbaren Bakterien, die sehr sensitiv gegenüber Kulturbedingungen wie Temperatur, Medium und Inkubationsdauer reagieren. Es bilden sich nur quantifizierbare Kolonien, wenn sich die Bakterien in einer ausreichenden Rate teilen. Das LIVE/DEAD® BacLight™ hingegen ermöglicht es durch simultane Anfärbung zwischen noch existenzfähigen und toten Bakterien zu unterscheiden (Boulos et al., 1999). Das Kit besteht aus zwei an Nukleinsäure-

bindenden Färbemitteln, wobei sich durch Anfärbung und anschließendem Auszählen der Zustand der Bakterien in einer Bakterienkultur differenzieren lässt. Die beiden verwendeten Farbstoffe unterscheiden sich aufgrund ihrer Fähigkeit Zellen zu penetrieren. Der Farbstoff *SYTO 9 dye* (1,67 mM, in DMSO, Excitation/Emission Maxima: 480/500 nm) durchdringt grundsätzlich bakterielle Membranen und färbt alle Bakterien grün. *Propidium iodine* (20 mM, in DMSO, Excitation/Emission Maxima: 490/635 nm) penetriert nur beschädigte Bakterienmembranen, wobei durch die Kombination der beiden Färbereagenzien tote Bakterien rot erscheinen (Product Information, Invitrogen GmbH, Darmstadt 2004; Boulos et al., 1999).

Für das *Live-Dead-Staining* wurde die Bakterien-ÜNK 1:20 verdünnt, eine OD₆₀₀ von 1,0 eingestellt bzw. die Wasseransätze (Kap. 3.2.12) untersucht und zweimal mit NaCl (0,85 %) gewaschen (Kap. 3.2.3). Experimentell ermittelt hat sich ein Färbereagenzverhältnis von 2 µl *SYTO 9 dye* und 1 µl *Propidium iodine* für 250 µl der gewaschenen Bakteriensuspension als geeignet erwiesen. Nach 15 Minuten lichtgeschützter Inkubation bei RT wurden 0,5 µl der angefärbten Bakteriensuspension auf einen Objektträger pipettiert und mit einem quadratischen Deckglas (18x18 mm) bedeckt. Zur Fixierung wurde Nagellack um das Deckgläschen aufgetragen und die Proben unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

3.2.13 Fluorescence activated cell sorting (FACS)-Analyse

Für die Untersuchung des antioxidativen Potentials von Anthocyanen wurde Wasserstoffperoxid (H₂O₂) eingesetzt. Über die Fenton-Reaktion (Kap. 1.2.2) werden hochreaktive Hydroxylradikale (OH•) erzeugt, die mit dem *reactive oxygen species* (ROS)-Indikator-Farbstoff Hydroxyphenylfluorescein (HPF) (Life Technologies GmbH) im Durchflusszytometer detektiert werden können. Neben der Untersuchung der Anthocyane wurden die für *E. coli* MG1655 (Wt) bakteriziden Antibiotika Ampicillin (30 µg/ml; Carl Roth GmbH + Co. KG) und Ciprofloxacin (250 ng/ml; Ciprobay®, Bayer Schering Pharma) eingesetzt. Dazu wurde eine ÜNK von *E. coli* MG1655 (Wt) 1:20 verdünnt und H₂O₂ (Endkonzentration: 0,2 %; Otto Fischer GmbH & Co. KG) zugegeben. In einem weiteren Ansatz wurde die Kombination H₂O₂ (Endkonzentration: 0,2 %) und *Dakapo* (77 µM) untersucht. Als Vergleichskontrollen diente jeweils ein Ansatz ohne Behandlung, nur mit *Dakapo* sowie mit Antibiotika-Behandlung. Nach drei Stunden lichtgeschützter Inkubation (37 °C, 180 rpm) und Messung der OD₆₀₀ wurde jeweils 1 ml der Bakterienkulturen abzentrifugiert (3 Min., 8.000 rpm), der Überstand abgenommen und das Pellet zweimal mit PBS (Dulbecco, Biochrom AG) gewaschen. Zur Detektion der •OH-Bildung wurde jeweils eine 1:10-Bakterienverdünnung mit HPF (Endkonzentration: 10 µM) für 30 Minuten lichtgeschützt bei RT angefärbt,

anschließend abzentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen und in jeweils 1 ml PBS in Polypropylene Tubes aufgenommen. Die folgenden Einstellungen wurden für die Analyse im FACS-Gerät (BD FACSCalibur, BD Bioscience) mit der Software BD CellQuest gewählt: E01 (FSC), 502 (SSC) und 701 (FL1). Das Gerät wurde mit BD FACSFlow Sheath Fluid, BD FACS Clean Solution und BD FACSRinse Solution nach Angaben des Herstellers gespült.

3.2.14 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

Die Wirkung von *Dakapo* gegenüber *L. monocytogenes* und *E. coli* durch Erzeugung von oxidativem Stress (H_2O_2) wurde mittels PFGE untersucht. Dazu wurden die ÜNK von *L. monocytogenes* bzw. *E. coli* ECO1069 MG1655 (Wt) 1:20 verdünnt und H_2O_2 (Endkonzentration: 0,3 % bzw. 0,2 %) oder *Dakapo* (77 μ M; 385 μ M) zugegeben. In einem weiteren Versuchsansatz mit *E. coli* wurde H_2O_2 (0,2 %) mit *Dakapo* (77 μ M) kombiniert. Unbehandelte Ansätze dienten als Vergleichskontrollen. Nach drei Stunden 30 Minuten (*L. monocytogenes*) bzw. drei Stunden (*E. coli*) Inkubation (37 °C, 180 rpm) (Kap. 3.2.8.1) wurde eine OD_{600} von 1,35 eingestellt und für 10 Minuten bei 6.000 rpm zentrifugiert. Es folgten zwei Waschschrte durch Zentrifugation (jeweils 13.000 rpm, 4 Min.) mit TE-Puffer [10 mM Tris:1 mM EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure), pH 8]. Für *E. coli* (Gram-negativ) wurde das Bakterienpellet in 400 μ l TE-Puffer resuspendiert, Proteinase K (Carl Roth GmbH + Co. KG) (Endkonzentration: 1 mg/ml) und 400 μ l handwarme Pulsfeld-Agarose (1,8 %; Bio-Rad Laboratoires) zugegeben, gemischt und in sogenannte *Plugs* (Disposable Plug Molds for the preparation of DNA-imbedded agarose plugs, Bio-Rad Laboratoires) pipettiert. Die Agarose-*Plugs* mussten ca. 5 Minuten bei 4 °C aushärten. Bei *L. monocytogenes* (Gram-positiv) wurde für die Zelllyse das Bakterienpellet vor dem Anfertigen der *Plugs* in 400 μ l TE-Puffer für 60 Minuten, 37 °C, 300 rpm mit Lysozym (Endkonzentration: 2 mg/ml) behandelt. Erst anschließend wurden Poteinase K und Agarose hinzugefügt und die *Plugs* gegossen. Die *Plugs* wurden in vorbereitete Röhrchen mit 5 ml cell lysis buffer [25 ml 1 M Tris, 50 ml 0,5 M EDTA, 50 ml N-Lauroylsarcosine sodium salt, 375 ml destilliertes H_2O] und Proteinase K (Endkonzentration: 0,1 mg/ml) gegeben und zwei Stunden im Wasserbad (54 °C, 150 rpm) inkubiert. Die Blöckchen wurden jeweils zweimal mit je 5 ml erwärmtem (54 °C) destilliertem H_2O und viermal mit temperiertem TE-Puffer gewaschen und zwischendurch für jeweils 10 Minuten ins Wasserbad gestellt. Nach dem letzten Waschgang konnten die *Plugs* in jeweils 5 ml TE-Puffer bei 4 °C gelagert werden.

Die *Plugs* wurden in die Taschen eines Agarosegels (1 %) gegeben ebenso wie ein Low Range PFG Marker oder Lambda Ladder PFG Marker (New England Biolabs

GmbH). Nach Abdichten der Taschen mit erwärmter Agarose (1,8 %) wurde das Gel in 0,5x TBE-Puffer in Block 1 bei 6 V, 14 °C, Switch 1-25 20 Stunden in der CHEF-DR® II (*clamped homogenous electric field*) Apparatur (Bio-Rad) laufen gelassen. Diese besteht aus der Elektrophoresekammer, einer Pumpe, die den Pufferkreislauf aufrechterhält, einer Kühl- und einer Kontrolleinheit zur Steuerung der Elektroden. Die 24 Elektroden sind hexagonal um das Gel angeordnet und das elektrische Feld wird durch ein Kontrollgerät zwischen zwei einander gegenüberliegenden Elektroden angelegt. Die Richtung der elektrischen Feldvektoren ist jeweils +60° bzw. -60° gegenüber der Richtung der vertikalen Achse des Gels verschoben. Im Ethidiumbromidfärbegrad (Endkonzentration: 1 mg/ml) wurde das Gel 15 Minuten gefärbt und 10 Minuten im Wasserbad entfärbt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Gel Doc XR, Quantity one 4.6.3 auf einem Geldokumentationssystem der Firma Bio-Rad Laboratoires.

3.2.15 Statistische Auswertung

Die Ermittlung der OD₆₀₀-Messwerte zur Erstellung der Wachstumskurven erfolgte mit dem Programm Magellan™-Data Analysis Software (Tecan Group Ltd.). Dabei wurde von den Messwerten eines jeden Messzeitpunktes das arithmetische Mittel gebildet und der gemittelte Leerwert (ohne Bakterien) von den Messwerten in den *Wells* mit Bakterien subtrahiert. Mit SigmaPlot 11.0 (Systat Software GmbH) wurden die konzentrationsabhängigen Dosis-Wirkungs-Beziehungen ausgewertet. Die Effekte der Anthocyane bzw. AMP wurden durch Vergleich der über einen Zeitraum von 24 Stunden gemessenen OD₆₀₀-Werte mit denen der Kontroll-Wachstumskurven ohne AMP- bzw. Anthocyan-Supplementation bei einer festgelegten Referenzkonzentration von 66 µM *Dakapo* (bzw. 20 µM Accent, 22 µM Heidelbeere, 108 µM Holunder) nach dem Schema in Tab. 9 ermittelt. Die Berechnungen der Referenzkonzentrationen basierten auf dem Anthocyan, das in der höchsten Menge in dem jeweiligen Extrakt vorlag (Tab. 4; Kap. 3.2.4).

Tab. 9: Einteilung der Determinanten zum Vergleich des Bakterienwachstums

Symbol	Abweichung der Versuchs- von der Kontrollwachstumskurve (in OD-Einheiten)	Interpretation
0	-0,1 bis 0,1	kein Effekt
-	-0,1 bis -0,25	schwache Wachstumsinhibition
--	-0,25 bis -0,5	mittlere Wachstumsinhibition
---	< -0,5	starke Wachstumsinhibition
+	+0,1 bis +0,25	schwache Wachstumsinduktion
++	+0,25 bis +0,5	mittlere Wachstumsinduktion
+++	> +0,5	starke Wachstumsinduktion

Die *in vivo*-Experimente wurden in Microsoft Excel 2010 (Microsoft Deutschland GmbH) eingetragen und nach Berechnung von Mittelwerten, Standardabweichung und Anwendung des *student's t-tests* (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$) graphisch dargestellt. Alle Experimente wurden in Dupli- oder Triplikaten und jeweils zwei oder drei biologisch unabhängige Versuche durchgeführt, wobei bei den Wachstumskurven jeweils ein Experiment exemplarisch dargestellt wird. Bei den Infektionsversuchen ist die verwendete Larvenanzahl ($n = 10$ oder 20 Larven) pro Behandlungsgruppe jeweils beim Experiment angegeben. CLC Genomics Workbench 5.1 diente zur Transkriptomdatenauswertung ebenso wie die Datenbanken KEGG (Kanehisa & Goto, 2000), KEGG mapper (Billion, unveröffentlichte Software), GECO (Kuenne et al., 2007), MetaCyc (Caspi et al., 2012), EcoCyc (Keseler et al., 2011) und STRING 9.0. (Szklarczyk et al., 2011).

4 Ergebnisse

Zunächst werden die Wirkungen der Anthocyane und der antimikrobiellen Peptide (AMP) *in vitro* dargestellt, anschließend die Ergebnisse in *Galleria mellonella*. Diesen *in vivo*-Versuchen schließen sich die Transkriptomanalysen mit *L. monocytogenes* EGD-e Wildtyp (Wt) und dem enteroaggregativen-hämorrhagischen *E. coli* (EAHEC) (ST3305, Gießen) nach *Dakapo*-Behandlung und darauf basierende, weiterführende Experimente an.

4.1 In vitro-Versuche mit potenziell antimikrobiellen Substanzen

4.1.1 Einfluss Anthocyan-haltiger Beerenextrakte auf das Wachstum von Bakterien

4.1.1.1 Screening der Beerenextrakte

Die Auswirkungen von Anthocyan-haltigen Beerenextrakten und eines Holunderbeer-Liquids auf das Wachstum der in Tab. 10 aufgeführten Bakterien wurden untersucht. Die Testung der Substanzen an zahlreichen Bakterienspezies erfolgte im Rahmen eines BMBF-geförderten Projektes in der Doktorarbeit von Nora Würdemann (persönliche Mitteilung, 2012).

In der vorliegenden Dissertation wird der wachstumsinduzierende (*E. coli*; Abb. 11A) bzw. wachstumsinhibierende (*L. monocytogenes*; Abb. 11B) Effekt des Anthocyan-haltigen Traubenextraktes *Dakapo* gezeigt. Die ebenso getesteten Anthocyan-reichen Extrakte *Accent*, Heidelbeere und Holunder hatten vergleichbare Wirkungen wie *Dakapo* (Tab. 10). Auf der Abszisse ist die Zeit, auf der Ordinate die gemessene optische Dichte (OD₆₀₀) aufgetragen.

Die Effekte der Anthocyan-haltigen Zugaben sind in Tab. 10 dargestellt. Sie wurden durch Vergleich der über einen Zeitraum von 24 Stunden gemessenen OD₆₀₀-Werte mit denen der Kontroll-Wachstumskurven ohne Anthocyan-Supplementation nach dem Schema in Tab. 9 ermittelt. Grundlage war der jeweilige Zeitpunkt der stärksten Veränderung. Durch Anthocyan-haltige Extrakte war eine Wachstumsinduktion u.a. bei Vertretern der *Enterobacteriaceae* zu verzeichnen, während Enterokokken und *L. monocytogenes* schlechter wuchsen (Tab. 10).

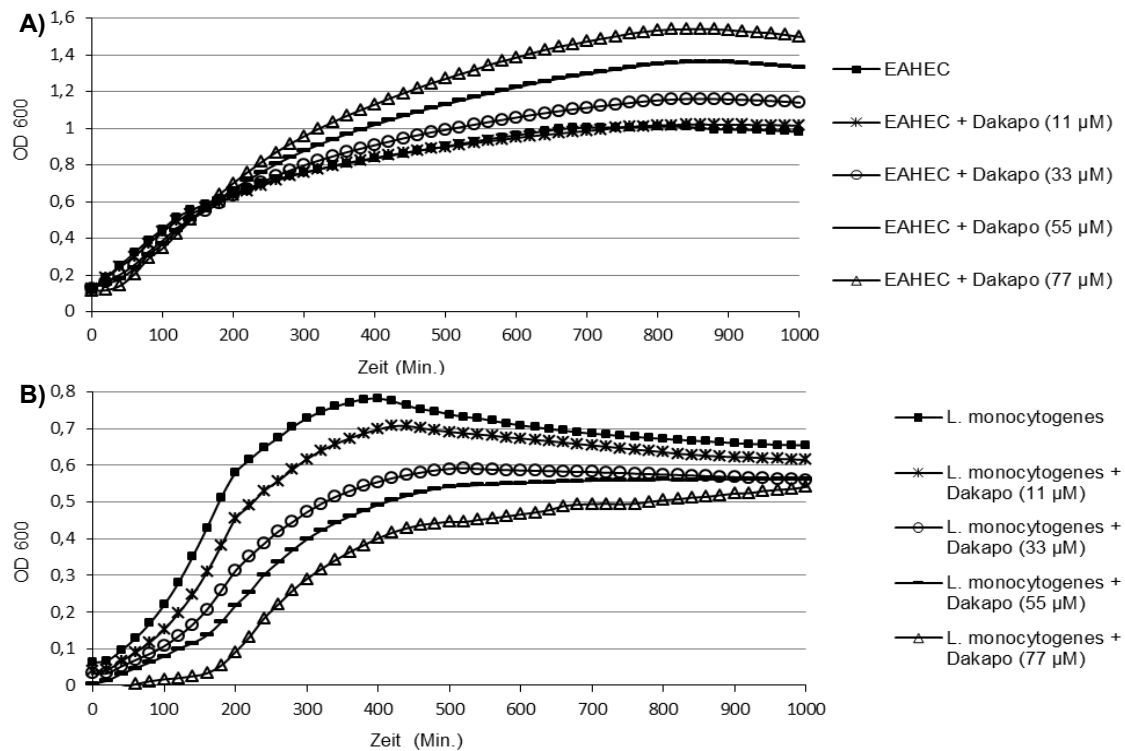


Abb. 11: In vitro-Effekt von Dakapo auf EAHEC und *L. monocytogenes*

Eine Übernachtskultur (ÜNK) von EAHEC (ST3305, Gießen) bzw. *L. monocytogenes* EGD-e (Wt) wurde 1:20 in den Wells der Mikrotiterplatte mit Nährmedium (Tab. 3) verdünnt. Nach Zugabe verschiedener Konzentrationen des Traubenextraktes *Dakapo* (Stocklösung: 660 µM) erfolgte die Messung der OD₆₀₀ alle 20 Min. im Mikrotiterplattenlesegerät. *Dakapo* hatte einen konzentrationsabhängig wachstumsinduzierenden Effekt auf EAHEC (A) und einen -inhibierenden auf *L. monocytogenes* (B).

Tab. 10: Bakterienwachstum verschiedener Spezies nach Inkubation mit Anthocyan-haltigen Substanzen

Bakterienstamm	Phänotyp	Herkunft	Accent	Dakapo	Heidelbeere	Holunder
EAHEC (2001)	Wt	41 (O104:H4)	++	++	++	++
EAHEC (2011)	Wt, ESBL	ST3305 (Gießen)	++	++	++	++
EAHEC (2011)	Wt, ESBL	S102644 (Frankfurt)	++	++	+	++
EAHEC (2011)	Wt, ESBL	E3503 (Lübeck)	++	++	++	++
EAHEC (2011)	Wt, ESBL	ST3431 Marburg	++	++	++	++
EHEC	Wt	EDL933 1051	++	++	++	++
<i>Enterococcus faecalis</i>	Wt, probiotisch	DSM 16431	--	--	--	--
<i>Enterococcus faecalis</i>	Wt, VRE	V583 ENT 1002	--	--	--	--
<i>Escherichia coli</i>	Wt	ECO1080 K12	++	+++	++	++
<i>Escherichia coli</i>	Wt	ECO1069 MG1655	++	+++	++	++
<i>Escherichia coli</i>	Wt, ESBL	CTX-M-15414	++	+++	++	+++
<i>Escherichia coli</i>	Wt, ESBL	CTX-M-15672	++	+++	+++	+++
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Wt, ESBL	MS39	+++	+++	+++	+++
<i>Listeria monocytogenes</i>	Wt	EGD-e LMO1052	--	--	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	Wt, MRSA	EDCC 5398 T625930	+++	+++	++	++

Eine Bakterien-ÜNK wurde 1:20 in den Wells einer Mikrotiterplatte mit geeignetem Nährmedium verdünnt (Tab. 3). Nach Zugabe der jeweiligen Anthocyan-reichen Substanz erfolgte die Messung der OD₆₀₀ alle 20 Min. über einen Zeitraum von 24 Std. im Mikrotiterplattenlesegerät. Angegeben ist das Ausmaß der Wachstumsinhibition (schwach: - ; mittel: -- ; stark: ---) oder -induktion (schwach: +; mittel: ++; stark: +++) (Einteilung Tab. 9) bei einer spezifisch für das jeweilige Extrakt festgelegten Referenzkonzentration (Kap. 3.2.4). Die Anthocyan-reichen Extrakte hatten eine eindeutig inhibitorische Wirkung auf Enterokokken und *L. monocytogenes*, während sie bei Vertretern der *Enterobacteriaceae* wie z.B. *E. coli* einen wachstumsfördernden Effekt zeigten.

4.1.1.2 Dosis-Wirkungs-Effekte

Die induzierenden (*E. coli*, *Klebsiella*, *S. aureus*) bzw. inhibierenden (*E. faecalis*, *L. monocytogenes*) Wirkungen von *Dakapo* wurden anhand der folgenden Dosis-Wirkungs-Beziehungen deutlich, wobei in den Darstellungen auf der Abszisse die Konzentration und auf der Ordinate die gemessene OD₆₀₀ aufgetragen sind (Abb. 12).

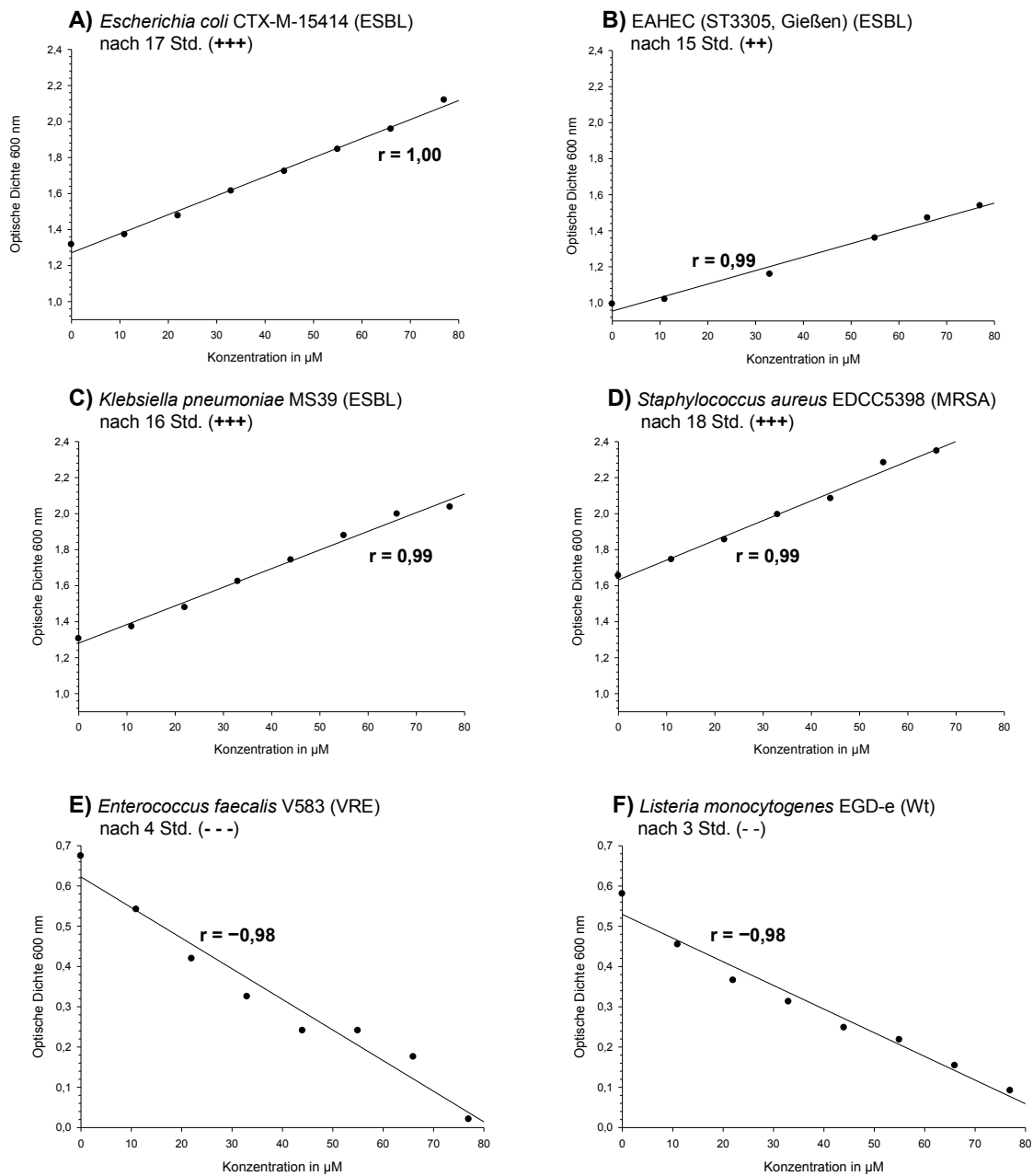


Abb. 12: Dosis-Wirkungs-Effekt von *Dakapo* auf das Wachstum von verschiedenen Bakterien

Eine Bakterien-ÜNK wurde 1:20 in den Wells einer Mikrotiterplatte mit geeignetem Nährmedium verdünnt (Tab. 3). Nach Zugabe verschiedener Konzentrationen *Dakapo* (Stocklösung: 660 μM) erfolgte die Messung der OD_{600} alle 20 Min. über einen Zeitraum von 24 Std. im Mikrotiterplattenlesegerät. Die Graphen zeigen die gemessene OD_{600} zum angegebenen Zeitpunkt. Die Erläuterung der Symbole befindet sich in Tab. 9. Der angegebene Korrelationskoeffizient (r) kann theoretisch Werte zwischen $-1,00$ und $+1,00$ annehmen, wobei bei einem Wert von $+1,00$ (wie bei **A**) (bzw. $-1,00$) ein vollständig positiver (bzw. negativer) linearer Zusammenhang zwischen den Merkmalen Konzentration und OD_{600} besteht. Die konzentrationsabhängig wachstumsinduzierenden (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*) (**A-D**) bzw. -inhibierenden (*E. faecalis*, *L. monocytogenes*) (**E,F**) Effekte des Traubenextraktes wurden deutlich.

4.1.1.3 Bestimmung der Lebendzellzahlen

Zur Verifizierung der Wachstumskurven und zum Test des Effektes höherer *Dakapo*-Konzentrationen wurden die koloniebildenden Einheiten (KBE) ermittelt. Dazu wurde in bestimmten Zeitabständen aus Röhrcchen (Abb. 13B), in denen die Bakterien mit und ohne *Dakapo* (3 mM) kultiviert wurden, ein Aliquot entnommen und ausplattiert. Die wachstumsinduzierende Wirkung von *Dakapo* auf EAHEC (Abb. 13A) und der -inhibierende Effekt auf *L. monocytogenes* EGD-e (Wt) (Abb. 13C) bestätigten sich.

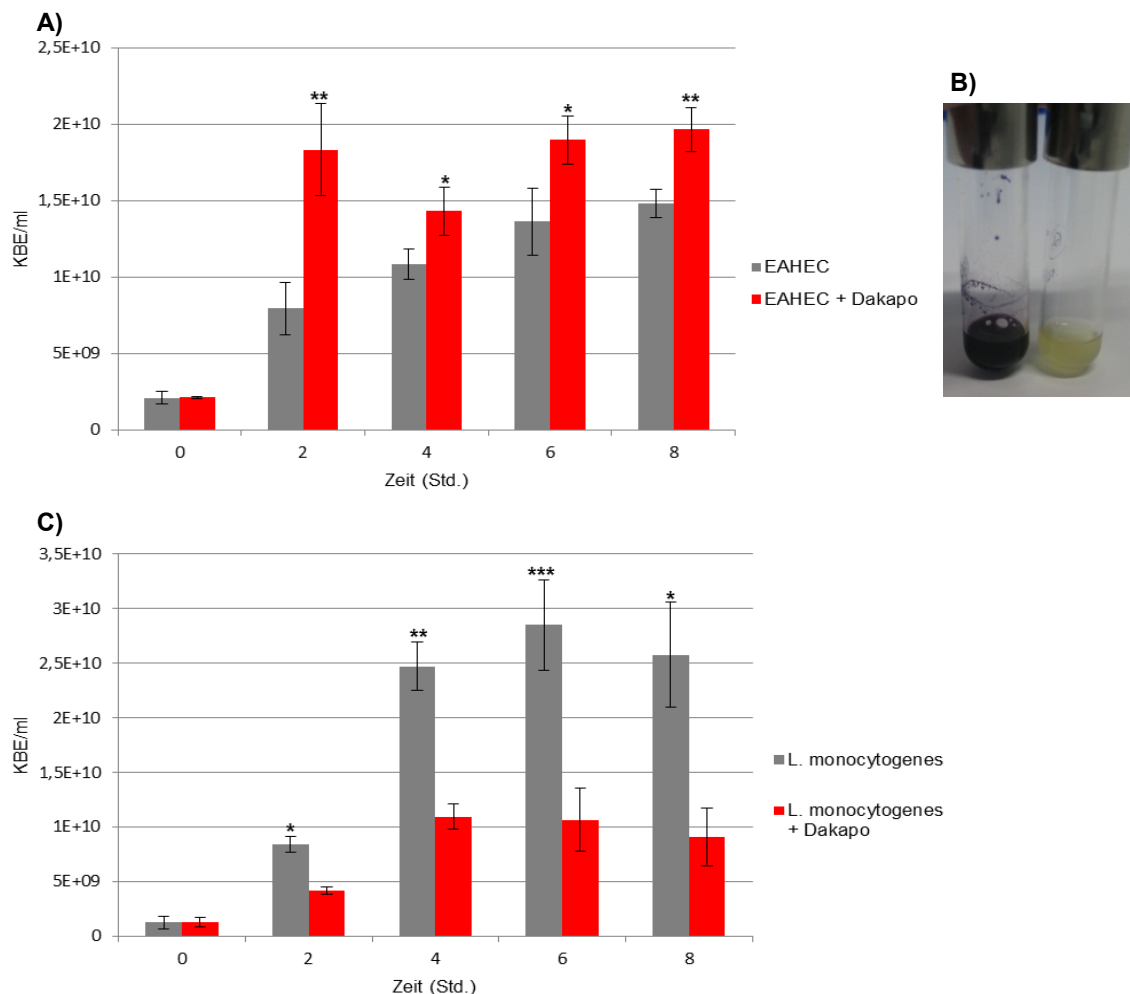


Abb. 13: Ermittlung der KBE von EAHEC und *L. monocytogenes* nach Inkubation mit *Dakapo*

Inkubation von EAHEC (ST3305, Gießen) über einen Zeitraum von 8 Std. (37 °C, 180 rpm) in Reagenzgläsern (B) bzw. von *L. monocytogenes* EGD-e (Wt) in je 1 ml Nährmedium (Tab. 3) mit und ohne *Dakapo* (Endkonzentration: 3 mM). Die KBE wurden alle 2 Std. nach Verdünnungsreihe mit NaCl durch Ausplattieren auf je drei Agarplatten (Tab. 3) und Inkubation der Agarplatten über Nacht bei 37 °C bestimmt. *Dakapo* induzierte das Wachstum von EAHEC signifikant (A), während das Wachstum von *L. monocytogenes* signifikant inhibiert wurde (C) (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,005).

4.1.2 Einfluss von AMP auf das Wachstum verschiedener Bakterien

4.1.2.1 Screening der Peptide

Auf der Suche nach neuen Antiinfektiva wurde im Hochdurchsatzverfahren im Mikrotiterplattenlesegerät ein Screening potenzieller AMP durchgeführt (Testkonzentration: 1 mg/ml). Exemplarisch für die inhibitorische Wirkung des AMPs *Apidaecin 1A* von *Apis mellifera* gegenüber Gram-negativen Bakterien wird die

Wachstumskurve von EAHEC gezeigt (Abb. 14). Auf das Wachstum von Gram-positiven Spezies wie *S. aureus*, *E. faecalis* und *L. monocytogenes* (Wt) hatte *Apidaecin 1A* (1 mg/ml) keinen Effekt (Tab. 11).

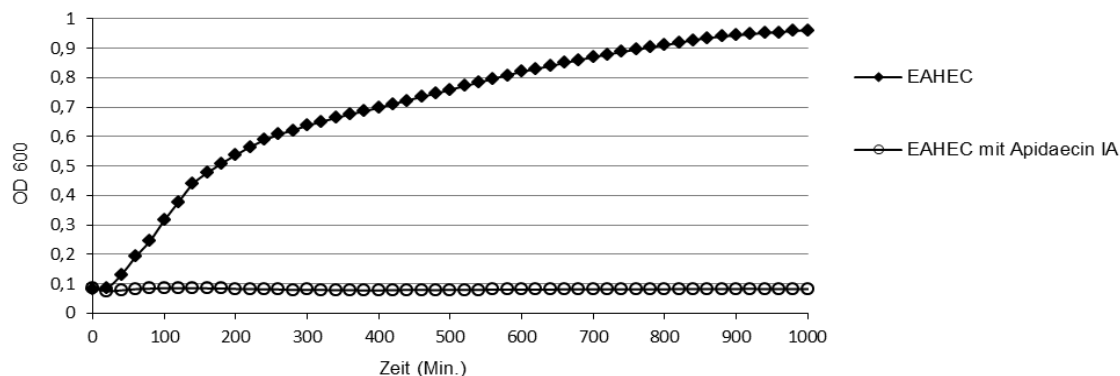


Abb. 14: Wachstum von EAHEC nach Zugabe von *Apidaecin 1A*

Eine ÜNK von EAHEC (ST3305, Gießen) wurde 1:20 in den Wells der Mikrotiterplatte mit LB-Nährmedium verdünnt. Nach Zugabe von *Apidaecin 1A* von *Apis mellifera* (Endkonzentration: 1 mg/ml) erfolgte die Messung der OD₆₀₀ alle 20 Min. im Mikrotiterplattenlesegerät. *Apidaecin 1A* hatte einen bakteriziden Effekt auf EAHEC.

In Tab. 11 sind die Wirkungen verschiedener Insekten-AMP gegenüber Gram-negativen und -positiven Bakterien dargestellt. Dabei wurden die über einen Zeitraum von 24 Stunden gemessenen OD₆₀₀-Werte mit denen der Kontroll-Wachstumskurven ohne AMP-Zugabe verglichen. Die Bewertung der Wachstumsinhibition erfolgte zum jeweiligen Zeitpunkt der stärksten Inhibition beim Testen einer AMP-Konzentration von 1 mg/ml anhand der Konventionen in Tab. 9. Bei wirksamen AMP wurden weitere AMP-Konzentrationen untersucht und eine minimale Hemmkonzentration (MHK) angegeben, wenn über einen Zeitraum von 24 Stunden kein Wachstum festzustellen war. Dabei zeigte sich bei einigen AMP ein inhibitorischer Effekt gegenüber Gram-negativen Spezies. Allerdings hatten die Substanzen keine nennenswerten Wirkungen auf Gram-positive Vertreter mit Ausnahme von *Defensin Tca1* aus *Tribolium castaneum*. Dieses Cys-reiche AMP mit korrekt verknüpften Disulfidbrücken wirkte wachstumshemmend gegenüber *L. monocytogenes*, Methicillin-resistentem *Staphylococcus aureus* (MRSA) und *E. coli*. Drei weitere getestete *Defensine* von *T. castaneum* mit willkürlich verknüpften Schwefel-Brücken (*Tca1randomSS*, *Tca2randomSS*, *Tca3randomSS*) zeigten jedoch eine geringere bis keine antibakterielle Wirkung (Tab. 11).

Tab. 11: Bakterienwachstum verschiedener Spezies nach Inkubation mit AMP von Insekten

Peptid	Organismus	<i>E. coli</i> CTX-M- 15414 (ESBL)	EAHEC (ST3305, Gießen) (ESBL)	<i>K. pneu-</i> <i>monia</i> MS39 (ESBL)	<i>S. aureus</i> EDCC 5398 T625930 (MRSA)	<i>E. faecalis</i> V583 (VRE)	<i>L. mono-</i> <i>cytogenes</i> EGD-e (Wt)	<i>L. mono-</i> <i>cytogenes</i> EGD-e ΔsodA
Abaecin	<i>Bombus pascuorum</i>	n.b.	0	0	0	0	0	n.b.
Alo3	<i>Acrocinus longimanus</i>	0	n.b.	0	0	0	0	0
Apidaecin	<i>Bombus pascuorum</i>	---	---	---	0	0	0	--
Apidaecin 1A	<i>Apis mellifera</i>	---	---	---	0	0	0	-
		(0,5 mg/ml)	(1 mg/ml)					
Cecropin A	<i>Aedes aegypti</i>	---	---	---	0	0	0	-
			(1 mg/ml)	(0,5 mg/ml)				
Cecropin A	<i>Hyalophora cecropia</i>	---	---	---	-	0	0	-
			(1 mg/ml)	(1 mg/ml)				
Cecropin-D-like-peptide	<i>Galleria mellonella</i>	-	n.b.	0	0	0	0	n.b.
Ceratotoxin	<i>Ceratitis capitata</i>	---	---	---	0	0	0	---
Defensin	<i>Aeshna cyanea</i>	0	n.b.	0	-	0	0	0
Defensin Tca1	<i>Tribolium castaneum</i>	--	n.b.	0	---	0	---	---
					(0,1mg/ml)		(0,2 mg/ml)	(0,1 mg/ml)
Tca1random SS	<i>Tribolium castaneum</i>	0	n.b.	0	0	0	0	0
Tca2random SS	<i>Tribolium castaneum</i>	-	n.b.	-	0	0	0	0
Tca3random SS	<i>Tribolium castaneum</i>	0	n.b.	0	0	0	0	0
Drosocin	<i>Drosophila melanogaster</i>	0	---	0	0	0	0	-
Drosomycin	<i>Drosophila melanogaster</i>	0	n.b.	0	0	0	0	0
Formaecin-1	<i>Myrmecia gulosa</i>	0	n.b.	0	0	0	0	n.b.
Gallerimycin	<i>Galleria mellonella</i>	0	n.b.	0	0	0	0	0
Helimicin	<i>Heliothis virescens</i>	0	n.b.	0	0	0	0	0
Lebocin-1	<i>Bombyx mori</i>	n.b.	0	0	0	0	0	n.b.
Metalnikowin -1	<i>Palomena prasina</i>	---	---	0	0	0	0	-
Metalnikowin -2A	<i>Palomena prasina</i>	---	---	-	0	0	0	-
Metchniko-win-1	<i>Drosophila melanogaster</i>	n.b.	0	0	0	0	0	n.b.
Metchniko-win-2	<i>Drosophila melanogaster</i>	n.b.	0	0	0	0	0	n.b.
Pyrrhocoricin	<i>Pyrrhocoris apterus</i>	--	--	0	0	0	0	-
Sapecin	<i>Sarcophaga peregrina</i>	0	n.b.	-	-	0	0	0
Sarcotoxin 1A	<i>Sarcophaga peregrina</i>	---	---	---	-	0	0	-
Spinigerin	<i>Pseudacantho- termes spiniger</i>	n.b.	-	0	--	0	0	n.b.
Stomoxyn	<i>Stomoxys calcitrans</i>	---	---	---	0	0	0	--
		(0,5 mg/ml)	(1 mg/ml)	(0,1 mg/ml)				
Termicin	<i>Pseudacantho- termes spiniger</i>	0	n.b.	0	0	0	0	0

Eine Bakterien-ÜNK wurde 1:20 in den Wells einer Mikrotiterplatte mit Nährmedium verdünnt (Tab. 3). Nach Zugabe des jeweiligen AMPs (Endkonzentration: 1 mg/ml; bei effizienten AMP wurden ebenso geringere Konzentrationen untersucht) erfolgte die Messung der OD₆₀₀ alle 20 Min. über einen Zeitraum von 24 Std. im Mikrotiterplattenlesegerät. Angegeben ist sofern ermittelbar die MHK in mg/ml oder das Ausmaß der Wachstumsinhibition (schwach: - ; mittel: -- ; stark: ---) (Einteilung Tab. 9). Die meisten getesteten AMP hatten allerdings keinen wachstumshemmenden Effekt auf die Bakterien (angezeigt mit dem Zeichen 0) (n.b. = nicht bestimmt).

Zur Ergründung möglicher Wirkmechanismen der AMP wurden die Substanzen an Mutanten von *L. monocytogenes* getestet. Die $\Delta oppA$ -Mutante ($\Delta lmo2196$), bei der das deletierte Gen für einen in den Oligopeptidtransport involvierten 62-KDa ABC (Adenosintriphosphat (ATP)-*binding cassette*)-Transporter (558 AS) auf der äußeren Seite der Zytoplasmamembran kodiert (*Oligopeptide transport system substrate-binding protein*) (Borezee et al., 2000), zeigte sich weniger sensibel gegenüber *Defensin Tca1* als der Wt (Abb. 15). Die $\Delta sodA$ -Mutante ($\Delta lmo1439$) hingegen war empfindlicher gegenüber einigen der AMP, insbesondere gegenüber *Ceratotoxin* (Tab. 11).

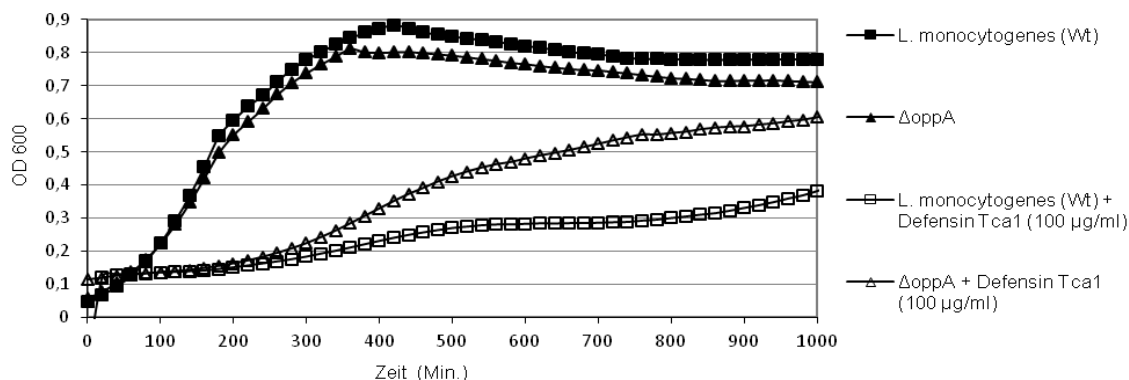


Abb. 15: Effizienz von *Defensin Tca1* gegenüber *L. monocytogenes* $\Delta oppA$ und Wt

Eine ÜNK von *L. monocytogenes* EGD-e (Wt) bzw. der $\Delta oppA$ ($\Delta lmo2196$)-Mutante wurde 1:20 in den Wells einer Mikrotiterplatte mit BHI-Nährmedium verdünnt. Nach Zugabe des *Defensins Tca1* (Endkonzentration: 100 µg/ml) erfolgte die Messung der OD₆₀₀ alle 20 Min. im Mikrotiterplattenlesegerät. Die $\Delta oppA$ -Mutante zeigte sich resistenter gegenüber *Defensin Tca1* als der Wt.

4.1.2.2 Dosis-Wirkungs-Effekte

Nach Identifizierung effizienter AMP wurden konzentrationsabhängige Wirkungsunterschiede ermittelt. Dabei zeigte sich einerseits eine lineare Beziehung zwischen Dosis und Wirkung (*Cecropin A* und *Stomoxyn*) (Abb. 16A,B; Abb. 17A,B). Allerdings kam es in einigen Fällen erst ab einer bestimmten AMP-Konzentration zu einer Art „Quantensprungereignis“ (\triangle) bei *E. coli* mit *Ceratotoxin* und *Metalnikowinen* (Abb. 16C,D; Anhang A4); bei *K. pneumoniae* mit *Ceratotoxin* und *Sarcotoxin 1A* (Abb. 17C,D). *Defensin Tca1* war das einzige AMP, dass gegen die Gram-positiven Bakterien MRSA und *L. monocytogenes* in relativ niedrigen Konzentrationen (100 µg/ml bzw. 200 µg/ml) wirksam war (Abb. 18). In den folgenden Grafiken (Abb. 16; Abb. 17; Abb. 18; Anhang A4,A5) sind auf der Abszisse jeweils die AMP-Konzentrationen (logarithmische Skalierung), auf der Ordinate die Zeit bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,4 aufgetragen, die allerdings bei sehr wirksamen AMP wie *Stomoxyn* (Abb. 17B) oder *Defensin Tca1* (Abb. 18A) nur bei geringen AMP-Konzentrationen erreicht werden konnte, da bei höheren Konzentrationen (>100 µg/ml) kein Bakterienwachstum mehr möglich war.

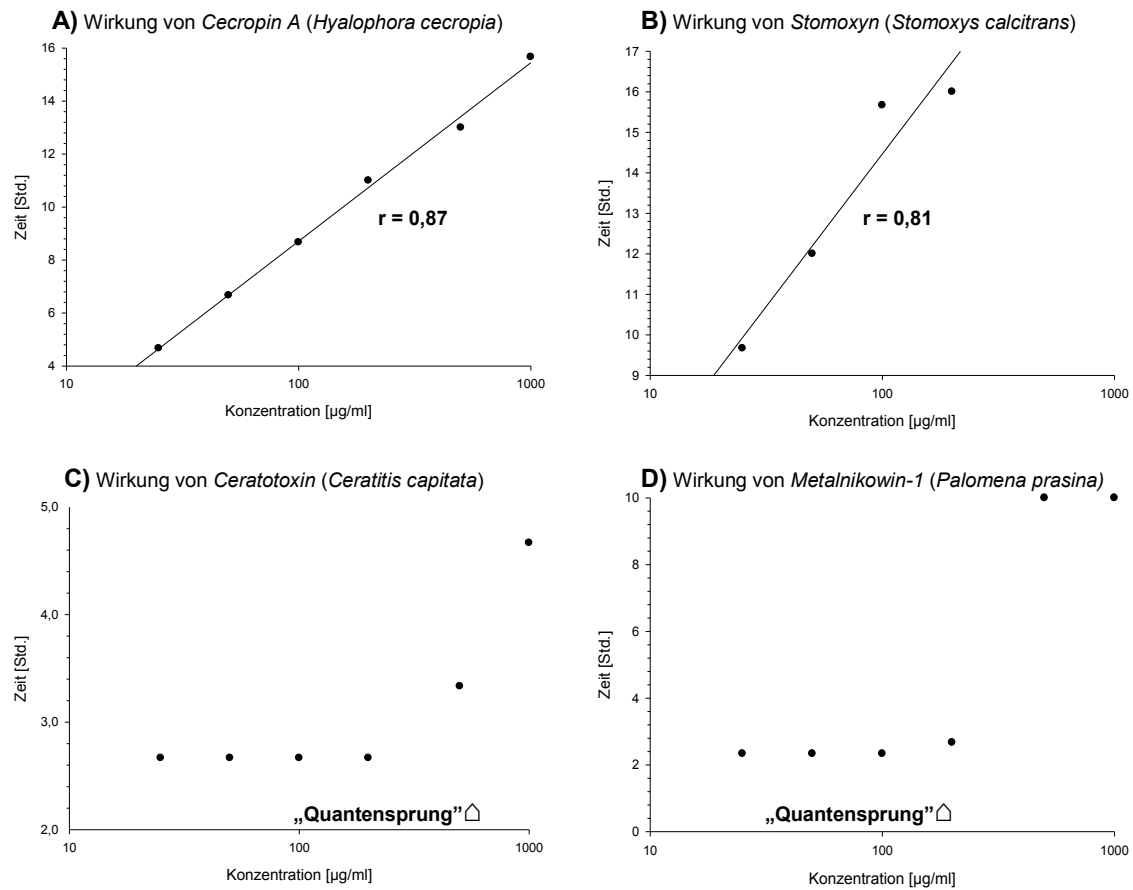


Abb. 16: Dosis-Wirkungs-Effekte von AMP auf *E. coli* (ESBL)

Eine ÜNK von *E. coli* CTX-M-15414 (ESBL) wurde 1:20 in den Wells einer Mikrotiterplatte mit LB-Nährmedium verdünnt. Nach Zugabe verschiedener Konzentrationen (25; 50; 100; 200; 500; 1000 µg/ml) des jeweiligen AMPs (Stocklösung: 10 mg/ml) erfolgte die Messung der OD₆₀₀ alle 20 Min. über einen Zeitraum von 24 Std. im Mikrotiterplattenlesegerät. Die Graphen zeigen die Zeit bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,4. Der angegebene Korrelationskoeffizient (r) kann theoretisch Werte zwischen -1,00 und +1,00 annehmen, wobei bei einem Wert von +1,00 (bzw. -1,00) ein vollständig positiver (bzw. negativer) linearer Zusammenhang zwischen den Merkmalen Konzentration und OD₆₀₀ besteht. *Cecropin A* (A) und *Stomoxyn* (B) hatten einen dosisabhängigen Hemmeffekt, während *Ceratotoxin* (C) und *Metalnikowin-1* (D) erst ab einer Konzentration von 500 µg/ml wirksam waren („Quantensprungereignis“, \triangle).

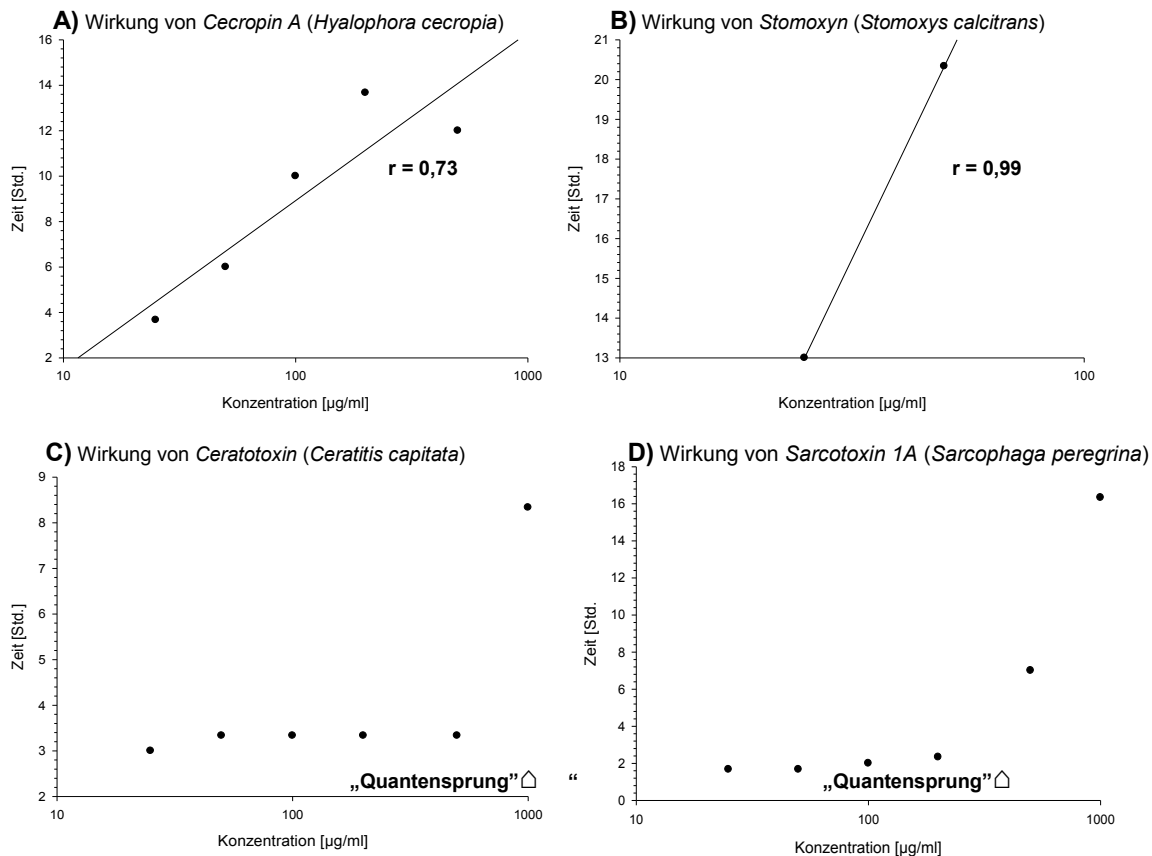


Abb. 17: Dosis-Wirkungs-Effekte von AMP auf *K. pneumoniae* (ESBL)

Eine ÜNK von *K. pneumoniae* MS39 (ESBL) wurde 1:20 in den Wells einer Mikrotiterplatte mit LB-Nährmedium verdünnt. Nach Zugabe verschiedener Konzentrationen (25; 50; 100; 200; 500; 1000 $\mu\text{g/ml}$) des jeweiligen AMPs (Stocklösung: 10 mg/ml) erfolgte die Messung der OD₆₀₀ alle 20 Min. über einen Zeitraum von 24 Std. im Mikrotiterplattenlesegerät. Die Graphen zeigen die Zeit bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,4. Der angegebene Korrelationskoeffizient (r) kann theoretisch Werte zwischen -1,00 und +1,00 annehmen, wobei bei einem Wert von +1,00 (bzw. -1,00) ein vollständig positiver (bzw. negativer) linearer Zusammenhang zwischen den Merkmalen Konzentration und Zeit bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,4 besteht. *Cecropin A* (A) und *Stomoxyn* (B) zeigten einen dosisabhängigen Hemmeffekt, während *Ceratotoxin* erst ab einer Konzentration von 1 mg/ml (C) bzw. *Sarcotoxin 1A* ab 500 $\mu\text{g/ml}$ effizient waren (D) („Quantensprünge“, \triangle).

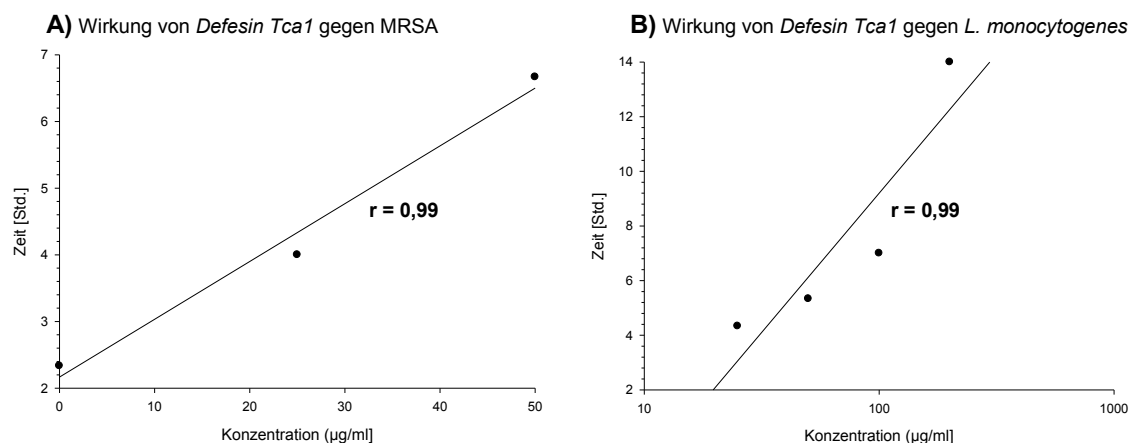


Abb. 18: Dosis-Wirkungs-Effekte von Defensin Tca1 von *T. castaneum* auf MRSA und *L. monocytogenes* (Wt)

Eine ÜNK von MRSA EDCC 5398 T625930 oder *L. monocytogenes* EGD-e (Wt) wurde 1:20 in den Wells einer Mikrotiterplatte mit BHI-Nährmedium verdünnt. Nach Zugabe verschiedener Konzentrationen (25; 50; 100; 200; 500; 1000 $\mu\text{g/ml}$) des *Defensins Tca1* (Stocklösung: 10 mg/ml) erfolgte die Messung der OD₆₀₀ alle 20 Min. über einen Zeitraum von 24 Std. im Mikrotiterplattenlesegerät. Die Graphen zeigen die Zeit bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,4. Der angegebene Korrelationskoeffizient (r) kann theoretisch Werte zwischen -1,00 und +1,00 annehmen, wobei bei einem Wert von +1,00 (bzw. -1,00) ein vollständig positiver (bzw. negativer) linearer Zusammenhang zwischen den Merkmalen Konzentration und Zeit bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,4 besteht. *Defensin Tca1* hatte gegen MRSA in einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ (A) (bakterizide Konzentration: 100 $\mu\text{g/ml}$, Tab. 11); gegen *L. monocytogenes* EGD-e (Wt) von 200 $\mu\text{g/ml}$ (B) einen nennenswerten Hemmeffekt.

4.2 In vivo-Versuche mit potenziell antimikrobiellen Substanzen

4.2.1 *G. mellonella* als alternatives Infektionsmodell zur Untersuchung von Pathogenität bei Bakterien

Für jede getestete Bakterienspezies wurden Dosis-Wirkungs-Versuche in *G. mellonella* durchgeführt, um eine geeignete Infektionsdosis festzulegen, wie hier exemplarisch für *L. monocytogenes* EGD-e (Wt) gezeigt (Abb. 19).

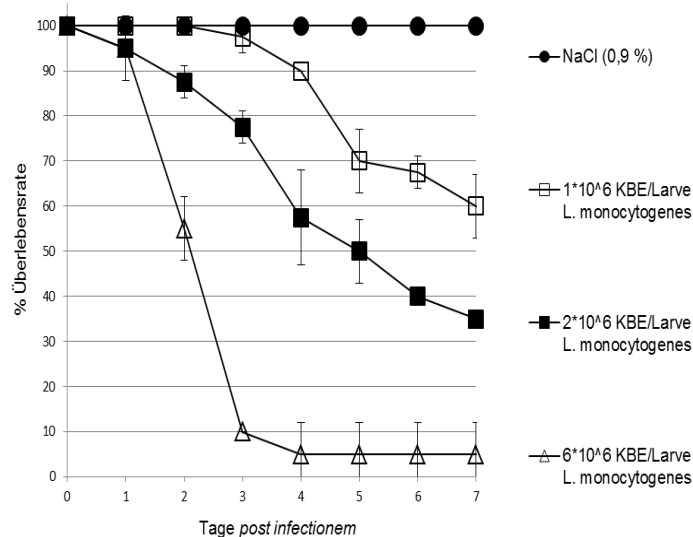


Abb. 19: Dosis-Wirkungs-Effekte nach Infektion von *G. mellonella* mit *L. monocytogenes* (Wt)
Überlebensrate von *G. mellonella* nach Infektion mit verschiedenen Bakteriendosen von *L. monocytogenes* EGD-e (Wt) (n=10).

Es zeigten sich jedoch nicht nur Unterschiede zwischen verschiedenen Bakterienspezies, sondern ebenso zwischen Stämmen derselben Spezies wie z.B. bei *E. coli*. Nach einer Infektion mit EAHEC (ST3305, Gießen) (2011) überlebten bei einer Infektionsdosis von 10^5 KBE/Larve drei Tage nach Infektion 45 % der Larven (Abb. 20B), während bei einem anderen Isolat eines Extended-Spektrum- β -Laktamasen (ESBL)-produzierenden *E. coli* CTX-M-15414 aus Ägypten (dieser Stamm wurde für die AMP-Testungen in Tab. 11, Abb. 16, Anhang A4 und Abb. 23 verwendet) bereits mit einer Infektionsdosis von $4 \cdot 10^4$ KBE/Larve über die Hälfte der Larven tot waren (Abb. 20A). Getestet wurde der Einfluss des Shiga-Toxins (STX) *in vivo*. Es zeigte sich eine signifikant (***) höhere Überlebensrate der Larven nach Infektion mit der nicht-STX-produzierenden Mutante des Stammes EHEC EDL933 im Vergleich zum STX-produzierenden Wt. Nach Injektion des nicht-pathogenen Stammes *E. coli* ECO1080 K12 überlebten alle Larven (Abb. 20C). *G. mellonella* eignet sich ebenso als Modell zur Testung von antimikrobiellen Substanzen, denn z.B. war das Antibiotikum Meropenem in den Larven gegen EAHEC wirksam (Abb. 20D).

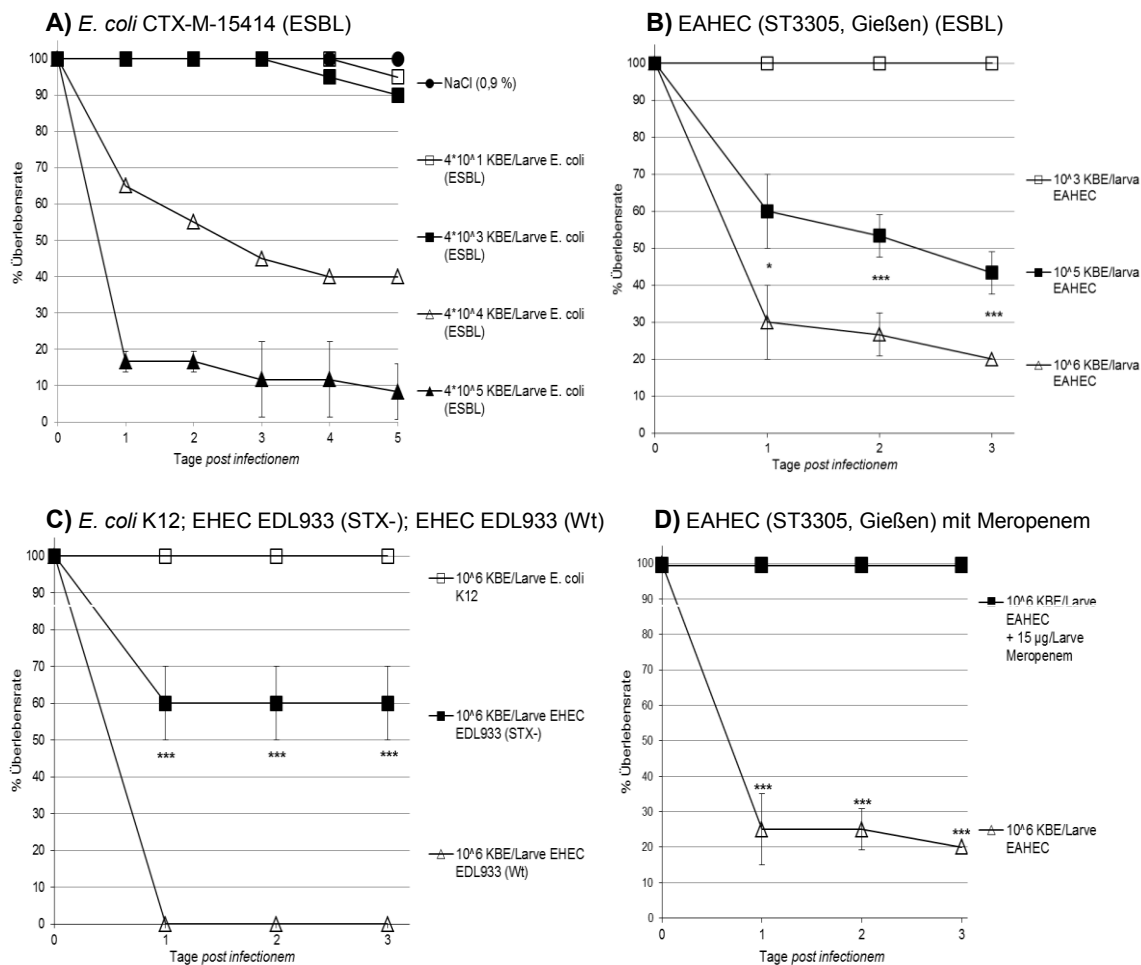


Abb. 20: Dosis-Wirkungs-Effekte nach Infektion von *G. mellonella* mit *E. coli* Stämmen; Schutzeffekt durch Meropenem gegenüber EAHEC

Beobachtung der Überlebensrate von *G. mellonella* nach Infektion mit verschiedenen Stämmen von *E. coli*. Die Stämme sind unterschiedlich pathogen: *E. coli* CTX-M-15414 (ESBL) (A) > EHEC EDL933 (Wt) (C) > EAHEC (ST3305, Gießen) (B) > EHEC EDL933 (STX-) (C) > *E. coli* ECO1080 K12 (C). Das *G. mellonella*-Infektionsmodell ist geeignet um die Effizienz von antimikrobiellen Substanzen zu testen. Meropenem schützte die Larven nach Infektion mit EAHEC (D) (* $p < 0,05$; *** $p < 0,005$) (n=10).

4.2.2 Infektionsversuche in *G. mellonella* mit Anthocyan-haltigen Beerenextrakten

Die *in vitro* ermittelten Effekte der Anthocyane konnten *in vivo* in den Larven verifiziert werden. *Dakapo* induzierte das Wachstum von multiresistenten (ESBL) *E. coli* CTX-M-15414 (Abb. 21A), EAHEC (ST3305, Gießen) (2011) (Abb. 21B), *K. pneumoniae* MS39 (Abb. 21D) und nicht-STX-produzierendem EHEC EDL933 (Abb. 21C), wodurch mehr Larven nach Zugabe des Extraktes starben. Der hemmende Effekt von *Dakapo* auf den Vancomycin-resistenten *E. faecalis* V583 (Abb. 22A) und *L. monocytogenes* EGD-e (Wt) (Abb. 22B) resultierte in einer signifikant höheren Überlebensrate der Larven, wenn Bakterien und *Dakapo* (153 µg/Larve) injiziert wurden.

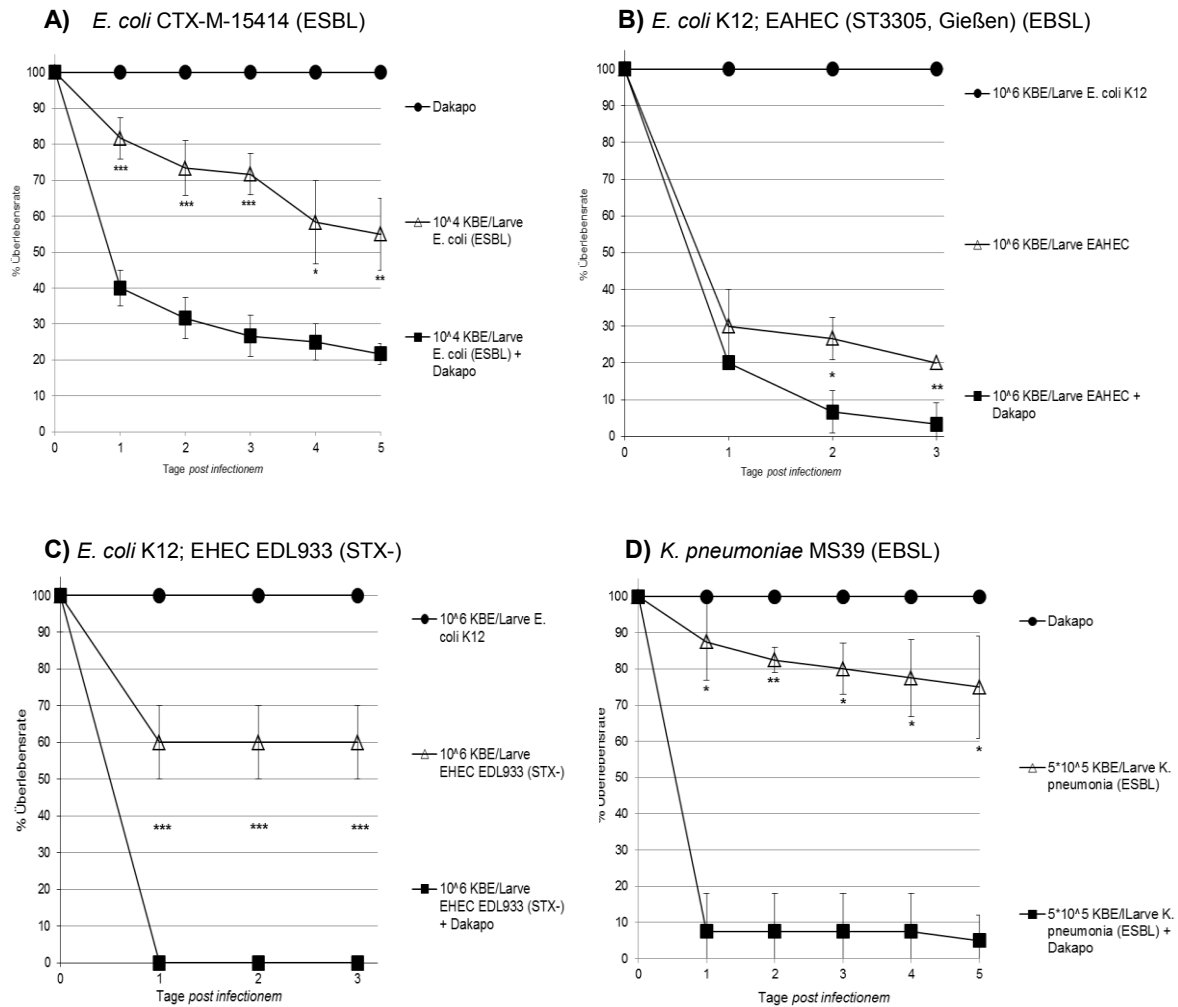


Abb. 21: In vivo-Wachstumsinduktion pathogener Bakterien durch Dakapo

Das Traubenextrakt *Dakapo* (*Dakapo*-Stocklösung: 6 mM) wurde kurz vor der Injektion mit den Bakterien zusammengeführt und in die Larven gespritzt. Durch die *Dakapo*-Behandlung (153 µg *Dakapo*/Larve) in Kombination mit Bakterien starben signifikant mehr Larven als bei der nur mit Bakterien infizierten Gruppe (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$), da das Traubenextrakt das Bakterienwachstum förderte (A-D). In der *Dakapo*-Kontrollgruppe (153 µg *Dakapo*/Larve) (A,D) bzw. der mit *E. coli* ECO1080 K12 infizierten Gruppe (B,C) überlebten alle Larven ($n=20$).

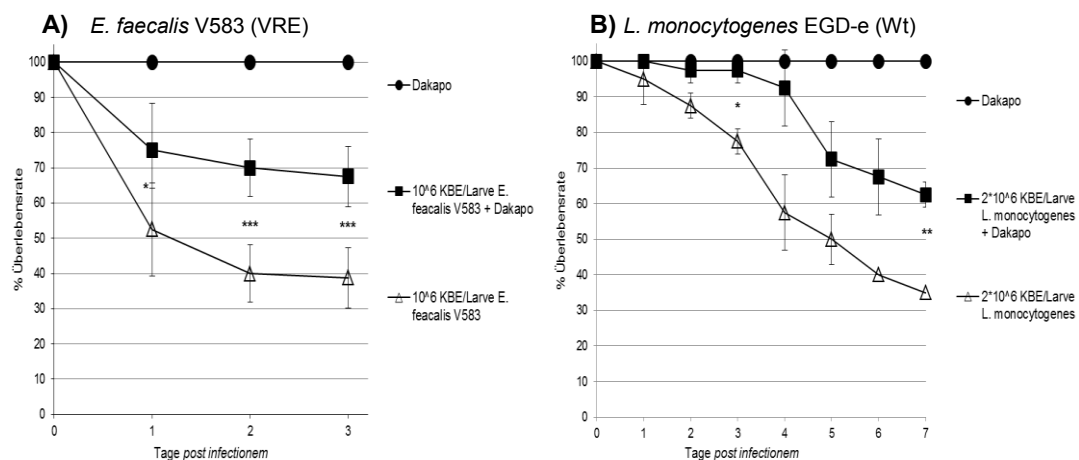


Abb. 22: In vivo-Schutzeffekt gegenüber pathogenen Bakterien durch Dakapo

Das Traubenextrakt *Dakapo* (*Dakapo*-Stocklösung: 6 mM) wurde kurz vor der Injektion mit den Bakterien zusammengeführt und in die Larven gespritzt. Durch die *Dakapo*-Behandlung (153 µg *Dakapo*/Larve) in Kombination mit Bakterien überlebten signifikant mehr Larven als bei der nur mit Bakterien infizierten Gruppe (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$). Das Traubenextrakt hatte einen Schutzeffekt gegenüber *E. faecalis* V583 (VRE) (A) und *L. monocytogenes* EGD-e (Wt) (B). In der *Dakapo*-Kontrollgruppe (153 µg *Dakapo*/Larve) überlebten alle Larven ($n=20$).

4.2.3 Infektionsversuche in *G. mellonella* mit wirksamen AMP

Die *in vitro* wirksamen AMP wurden im Insektenmodell in einer wirksamen Konzentration bezogen auf das Larvengewicht getestet. Alle Larven überlebten nach fünf Tagen, wenn Bakterien und jeweils eines der AMP in der angegebenen Menge in die Larven injiziert wurden (Kontrollgruppe Injektion von 1 % DMSO bzw. DMF). Dabei hatten insbesondere *Stomoxyn* (75 µg/Larve) gegen ESBL-produzierende *E. coli* CTX-M-15414 und *K. pneumoniae* MS39 (Abb. 23; Abb. 25) sowie *Defensin Tca1* gegen MRSA EDCC 5398 T625930 (15 µg/Larve) und *L. monocytogenes* EGD-e (Wt) (75 µg/Larve) auch in geringen Konzentrationen einen Schutzeffekt (Abb. 26).

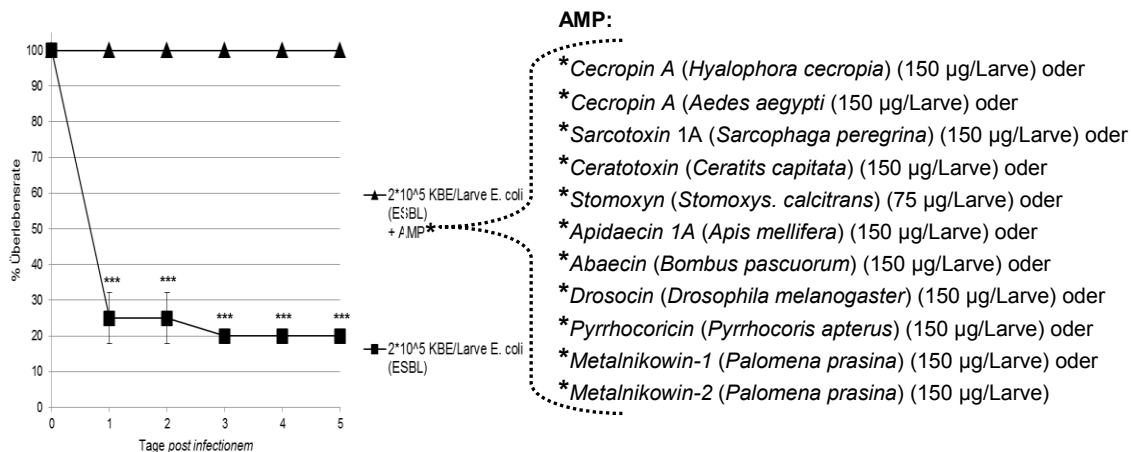


Abb. 23: In vivo-Schutzeffekt verschiedener AMP gegenüber *E. coli* (ESBL)

Jeweils eines der AMP wurde kurz vor der Injektion mit *E. coli* CTX-M-15414 (ESBL) vermischt und in die Larven gespritzt. Durch das AMP überlebten signifikant (***) mehr Larven im Vergleich zur Infektion mit Bakterien ohne AMP (n=10).

Abb. 24 zeigt die Wirksamkeit von *Pyrrhocoricin* bei Infektion mit *E. coli* (ESBL). Unbehandelt starben die infizierten Larven nach Melanisierung (Abb. 24A), während sich die AMP-behandelten Larven normal entwickelten und am Tag 5 das Puppenstadium erreichten (Abb. 24B).

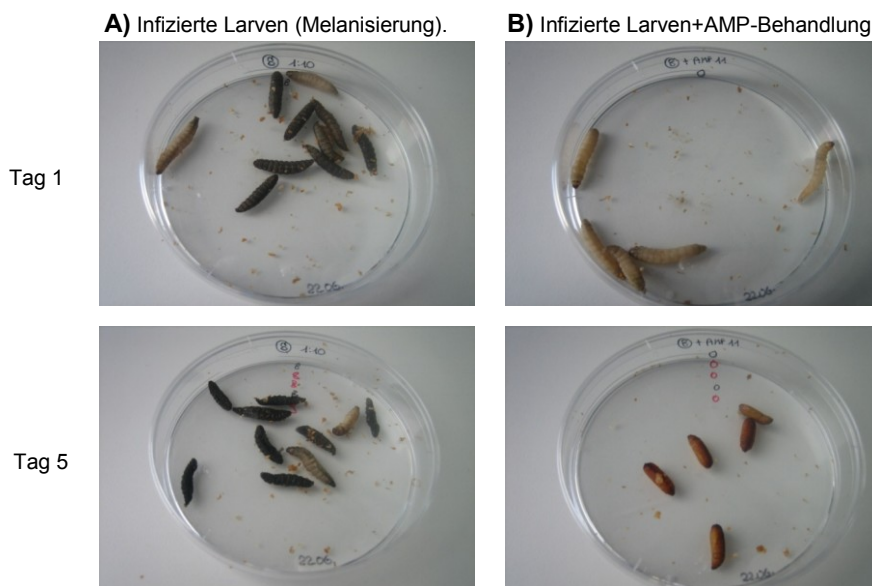


Abb. 24: Schutzeffekt von *Pyrrhocoricin* in *G. mellonella* gegenüber einer Infektion mit *E. coli* (ESBL)

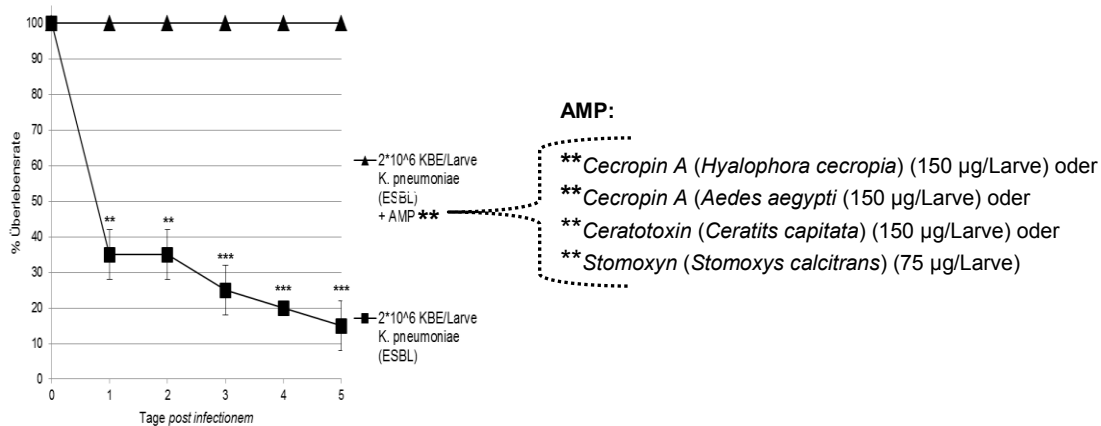


Abb. 25: In vivo-Schutzeffekt verschiedener AMP gegenüber *K. pneumoniae* (ESBL)

Jeweils eines der AMP wurde kurz vor der Injektion mit *K. pneumoniae* MS39 (ESBL) zusammengeführt und in die Larven gespritzt. Durch das AMP überlebten signifikant (** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$) mehr Larven im Vergleich zu mit Bakterien infizierten Larven ($n=10$).

A) *L. monocytogenes* (Wt) + Defensin Tca1 (75 µg/Larve) B) MRSA + Defensin Tca1 (15 µg/Larve)

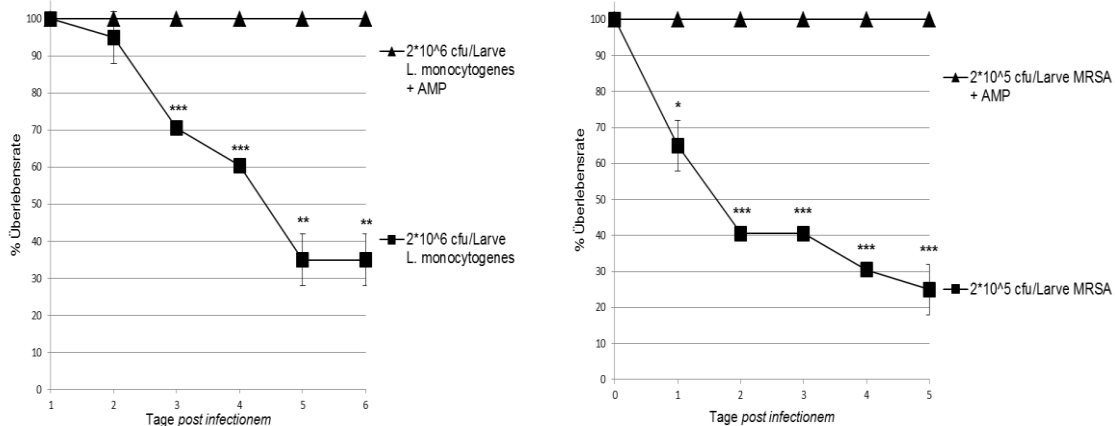


Abb. 26: In vivo-Schutzeffekt von Defensin Tca1 gegenüber Gram-positiven Bakterien

Defensin Tca1 wurde kurz vor der Injektion mit *L. monocytogenes* EGD-e (Wt) (A) bzw. MRSA EDCC 5398 T625930 (B) zusammengeführt und in die Larven gespritzt. Durch das AMP überlebten signifikant (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$) mehr Larven im Vergleich zu den mit Bakterien infizierten Larven ($n=10$).

4.3 Transkriptomanalyse mittels NGS

4.3.1 Einfluss von Dakapo auf das Wachstum von *L. monocytogenes*

Es stellte sich die Frage nach dem Mechanismus, der der Wachstumshemmung durch das Traubenextrakt *Dakapo* in *L. monocytogenes* EGD-e (Wt) zugrunde liegt. Dies wurde mittels einer Transkriptomanalyse untersucht. Dazu wurden die Bakterien bei 37 °C über einen Zeitraum von drei Stunden 30 Minuten im Kolben in BHI (*brain heart infusion*)-Flüssignährmedium (10 ml) mit und ohne *Dakapo* (77 µM) kultiviert und die OD₆₀₀ gemessen (ohne *Dakapo*: OD₆₀₀ 2,69; mit *Dakapo*: OD₆₀₀ 1,96). Es zeigte sich eine bräunliche Verfärbung des Nährmediums, das zuvor durch *Dakapo* blau gefärbt war (Abb. 27).

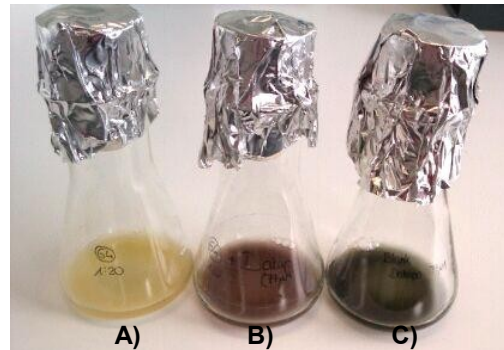


Abb. 27: *L. monocytogenes* (Wt) nach Kultivierung mit Dakapo, drei Stunden 30 Minuten, 37 °C
 Kultur im 100 ml Kolben, befüllt mit je 10 ml. **A:** *L. monocytogenes* EGD-e (Wt) unbehandelt in BHI-Nährmedium.
B: *L. monocytogenes* EGD-e (Wt) in BHI-Nährmedium + *Dakapo* (77 µM). **C:** Leerwert: BHI-Nährmedium + *Dakapo* (77 µM).

Die Konzentration der isolierten RNA wurde mit dem NanoDrop ermittelt (*L. monocytogenes* EGD-e ohne *Dakapo*: 921,9 ng/µl; *L. monocytogenes* EGD-e mit *Dakapo* (77 µM): 865,2 ng/µl) (Anhang A6). Die Qualität der anschließend isolierten RNA war in beiden Proben mit einem RIN von jeweils 10 hervorragend (Anhang A7) (Erläuterung zum RIN Kap. 3.2.8.2) (Schroeder et al., 2006).

Zur Analyse der Ursachen für die Wachstumsinhibition wurden die mit dem PGM™ Sequencer von Ion Torrent™ generierten Transkriptomdaten (Kap. 3.2.8.3) mit dem Programm CLC Genomics Workbench 5.1 gegen das entsprechende Referenzgenom angeordnet (*gemapped*). Der Stamm *L. monocytogenes* EGD-e LMO1052 (Glaser et al., 2001) wurde als Referenz verwendet. Anhand der RPKM-Werte (*reads per kilobase of exon model per million mapped reads*) auf Grundlage der *total gene reads* wurde ein *fold change* errechnet, der die Änderung der Genexpressionen nach Zugabe von *Dakapo* angibt. Es wurden folgende Formeln verwendet:

$$\text{RPKM} = \text{total gene reads} / [\text{mapped reads (millions)} \times \text{gene length (kb)}] \text{ und}$$

$$\text{Fold change} = \text{RPKM}_{\text{mit Dakapo}} / \text{RPKM}_{\text{ohne Dakapo}}$$

Dabei beschreiben die *total gene reads* alle *reads*, die zu einem Gen und seinen benachbarten Regionen gehören. *Mapped reads (millions)* bezeichnete die Summe der *total gene reads* von allen analysierten Genen. Insgesamt verfügt der sequenzierte Stamm *L. monocytogenes* EGD-e über 2853 Protein-kodierende Gene, 67 tRNA-Gene und sechs rRNA-Operons (Glaser et al., 2001). In der weiteren Analyse wurden (sofern nicht anders angegeben) nur Gene mit einem *fold change* von $\leq -1,9$ bzw. $\geq +1,9$ und mindestens 10 *reads* betrachtet. Danach wurden durch *Dakapo* 11 % (329 Gene) der gesamt 3.090 analysierten Gene reguliert, wobei von diesen 11 % 91 Gene vermindert und 238 Gene vermehrt exprimiert wurden (Abb. 28). Eine Auflistung der analysierten Gene befindet sich im Anhang A12.

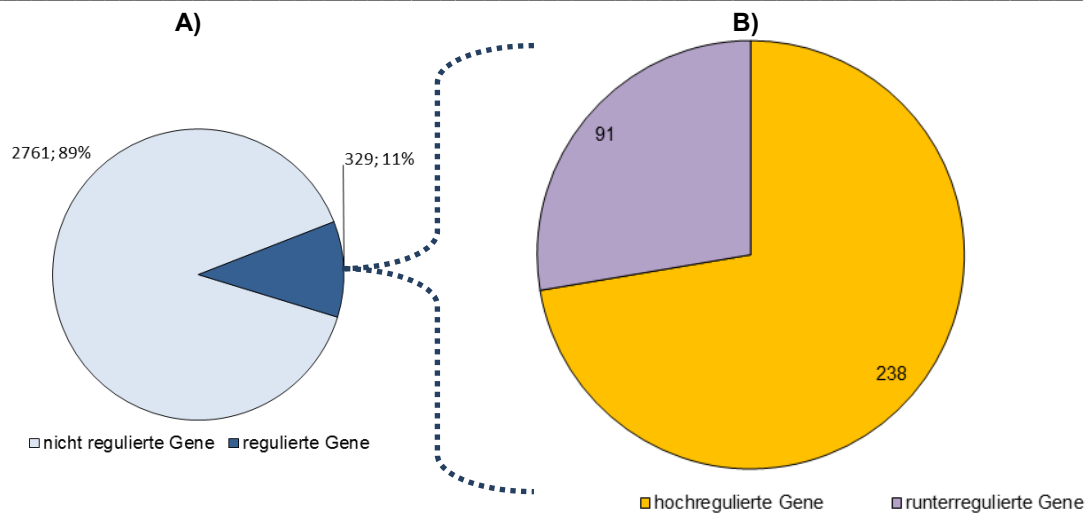


Abb. 28: Änderung der Genexpression in *L. monocytogenes* (Wt) durch *Dakapo*

In *L. monocytogenes* EGD-e (Wt) waren von 3.090 Genen, 329 (=11 %) durch die *Dakapo*-Behandlung reguliert (Kriterien: mindestens 10 reads, fold change: $\leq -1,9$ bzw. $\geq +1,9$) (A). Unter diesen Kriterien waren 238 Gene hoch- und 91 Gene runterreguliert (B).

Nach Kategorisierung der regulierten Gene mittels Informationen aus verschiedenen Datenbanken (Pubmed; UniProt, 2013; GECO, Kuenne et al., 2007) zeigte sich insbesondere eine Hochregulierung von β -Glukosidasen, Veränderungen bei Genen, die in die Stressantwort involviert sind und bei der Regulation der Transkription (Abb. 29). Auffällig vermindert exprimiert durch *Dakapo* waren verschiedene rRNAs und Transportsysteme der bakteriellen Zellen (Abb. 30).

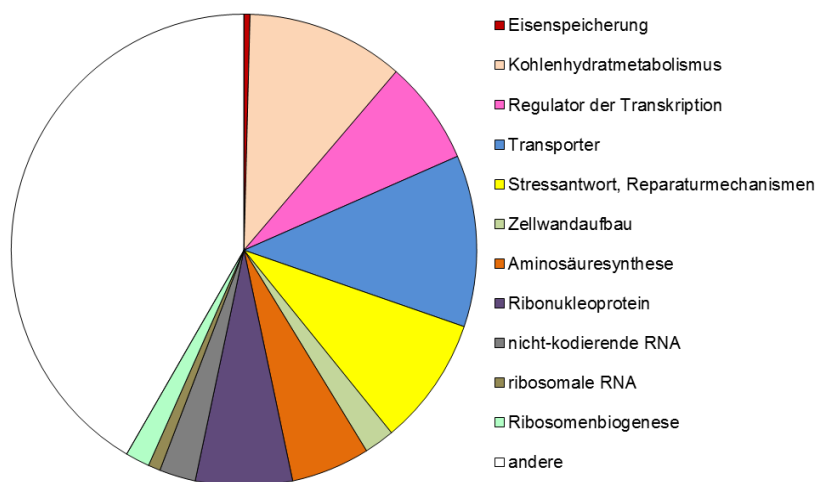


Abb. 29: Kategorisierung der durch *Dakapo* (77 μ M) induzierten Gene in *L. monocytogenes* (Wt)

Die Einteilung in Kategorien erfolgte anhand von Informationen aus den Datenbanken UniProt (2013), GECO (Kuenne et al., 2007) und Pubmed. Dabei wurden nur Gene beachtet, die den Kriterien „mindestens 10 reads, fold change: $\leq -1,9$ bzw. $\geq +1,9$ “ entsprachen.

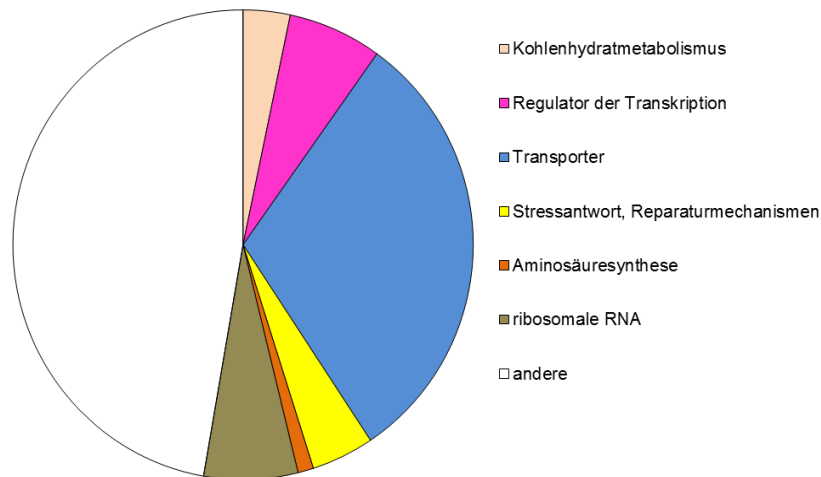


Abb. 30: Kategorisierung der durch *Dakapo* (77 µM) inhibierten Gene in *L. monocytogenes* (Wt)

Die Einteilung in Kategorien erfolgte anhand von Informationen aus den Datenbanken UniProt (2013), GECO (Kuenne et al., 2007) und Pubmed. Dabei wurden nur Gene beachtet, die den Kriterien „mindestens 10 reads, fold change: $\leq -1,9$ bzw. $\geq +1,9$ “ entsprachen.

Eine erste Analyse der generierten Daten erfolgte mit der Datenbank KEGG mapper (Billion, unveröffentlichte Software), in die alle Daten mit ≥ 10 reads und einem fold change ab -1,2 bzw. 1,2 und eingegeben wurden, um Hinweise auf die involvierten relevanten metabolischen Kreisläufe zu erhalten (Anhang A8). Zahlreiche in den Kohlenhydratstoffwechsel involvierte Gene (Stärke-, Saccharose-, Galaktose-, Fruktose-, Aminosäure-, Mannose-, Nukleotidzucker-Metabolismus, Glykolyse, Glukoneogenese) wurden durch *Dakapo* vermehrt exprimiert. Gleichzeitig waren aber andere Gene, die in dieselben Stoffwechselprozessen involviert sind, gehemmt, was auf eine sehr komplexe Regulation hinweist (Anhang A8).

4.3.1.1 Metabolische Genexpression

Die höchsten fold change-Werte waren bei verschiedenen β -Gukosidasen zu verzeichnen, wobei neun dieser Enzyme eine induzierte Expression unter Berücksichtigung der gewählten Selektionskriterien zeigten mit z.B. einem extremen fold change von +42,1 \uparrow bei *Imo0536* (kodiert für eine dieser 6-Phospho- β -Glukosidasen) (Abb. 31). Die Glykolyse war stimuliert, worauf die Hochregulierung von *Imo0517* (+10,0 \uparrow), das für die Phosphoglyceratmutase kodiert (Interkonversion von 2-Phosphoglycerat und 3-Phosphoglycerat) hindeutete. Ebenso schien der Citratzyklus verstärkt abzulaufen, da *Imo0355* (+3,3 \uparrow) (kodiert für Fumaratreduktase-Flavoprotein-Untereinheit) mit Succinatdehydrogenase-Aktivität (Succinat \rightarrow Fumarat) im Citratzyklus und im Komplex II der Elektronentransportkette, vermehrt exprimiert wurde. Die Degradation von durch die Glukosidasen abgespaltenen Zuckern im glykolytischen Abbauweg gefolgt vom Citratzyklus stimuliert die Oxidation von reduziertem Nicotinamadenindinukleotid (NADH) in der Elektronentransportkette. Die

vermehrte Genexpression von *atpE* (*Imo2534*) (H^+ -transportierende ATP-Synthase chain c) (+2,7↑) und *atpF* (*Imo2533*) (H^+ -transportierende ATP-Synthase chain b) (+2,3↑) deutete auf die Hyperaktivierung der Atmungskette und ATP-Produktion hin, was eine Induktion der Superoxidradikalbildung implizierte. Die Reaktion mit aufgenommenem Eisen (Fe) führte über die Fenton-Reaktion zur Hydroxylradikalbildung (OH^\bullet) und letztlich zu oxidativem Stress, dem die Bakterienzelle versucht entgegenzuwirken (Kap. 1.2.1; Kap. 1.2.2; Kap. 4.3.1.2).

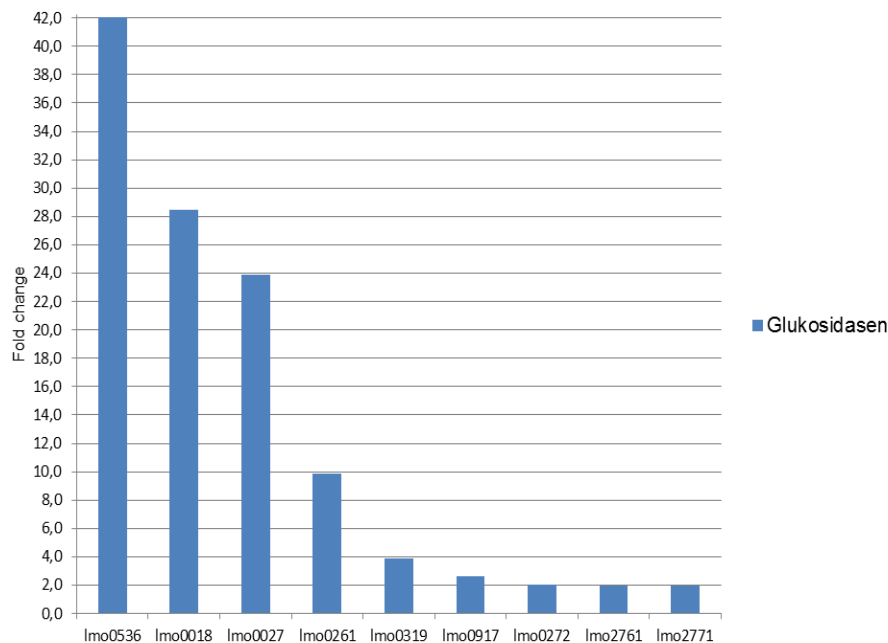


Abb. 31: Induktion von verschiedenen Glukosidasen durch *Dakapo* in *L. monocytogenes*

Die Transkriptomdatenanalyse zeigte unter Berücksichtigung der gewählten Kriterien „mindestens 10 reads, fold change: $\leq -1,9$ bzw. $\geq +1,9$ “ eine sehr starke Hochregulierung von verschiedenen β -Glukosidasen (*Imo0536*, *Imo0018*, *Imo0027*, *Imo0261*, *Imo0319*, *Imo0917*, *Imo0272*, *Imo2761*, *Imo2771*) in *L. monocytogenes* EGD-e (Wt) nach Behandlung mit dem Traubenextrakt *Dakapo* (77 μ M).

4.3.1.2 Stressantwort und DNA-Reparatur

Die bakterielle Zelle wird durch die Zugabe von *Dakapo* und das vermehrte Angebot von Kohlenhydraten und deren Metabolismus unter Stress gesetzt. Es war eine ausgeprägte Induktion von Genen der Stressregulation festzustellen (Abb. 29), wie *Imo2705* (+3,8↑), *recX* (*Imo1693*) (+2,8↑), *recO* (*Imo1460*) (+2,6↑), *recU* (*Imo1891*) (+2,2↑), *Imo1502* (+2,3↑), *recF* (*Imo0005*) (2,0↑), *dinG* (*Imo1899*) (+2,5↑). Ebenso wurden Gene für Kälteschockproteine, wie *cspL* (*Imo1364*) (+3,2↑) und *cspD* (*Imo1879*) (+3,0↑), aber auch für Hitzeschockproteine *clpQ* (*Imo1278*) (+3,4↑), *Imo0942* (+3,0↑), *Imo1736* (+2,5↑) und *hslU* (*Imo1279*) (+2,5↑) vermehrt exprimiert. Reparaturmechanismen von DNA-Doppelstrangbrüchen wie *Imo2267* (+3,8↑) und *addB* (*Imo2268*) (+2,1↑) waren als Antwort auf vermehrten oxidativen Stress induziert. *spxA* (*Imo2191*), ein transkriptionaler Regulator der Thiolhomöostase war stark runterreguliert (-3,0↓). Spx ist für die Erhaltung der Redoxhomöostase unter

Disulfidstress bedeutsam (Zuber, 2013; Zuber, 2004; Liebeke et al., 2008; Rochat et al., 2012). Dieses Gen regulierte ebenso Gene der Antwort auf oxidativen Stress wie *sodA* (*Imo1439*) (-1,9↓) (Mangan-abhängige Superoxiddismutase, zerstört Superoxidanion, $O_2^{\bullet-}$) (Vasconcelos & Deneer, 1994) und *Imo0998* (-2,8↓) (Glutathionperoxidase, reduziert Wasserstoffperoxid, H_2O_2), die beide runterreguliert waren. Die Runterregulierung dieser Enzyme verstärkte die Wachstumsinhibition. Der vermehrten Radikalbildung durch Abbau von Kohlenhydraten via glykolytischen Abbauweg versuchte die Bakterienzelle zwar durch Hochregulierung der Stressantwort entgegenzuwirken, aber das Übermaß an oxidativem Stress endete letztlich in der Wachstumsinhibition.

4.3.1.3 Eisenspeicherung

Das für die Bildung von OH^{\bullet} benötigte, reduzierte Fe^{2+} kann aus extrazellulärer Quelle aufgenommen oder intrazellulär aus Eisenspeicherproteinen und Fe-Sulfur-Clustern freigesetzt werden. Oxidativer Stress in Verbindung mit intrazellulären Eisenquellen schien durch *Dakapo* abgefangen zu werden, was auf die Hochregulierung des Eisenspeicherproteins Fri (Nicht-Hämeisen-bindendes Ferritin) zurückzuführen war (Kap. 1.2.2). Diese Hochregulierung von *fri* (*Imo0943*) (+2,0↑), bekannt als *DNA protection during starvation protein (dps)*, gab Hinweise darauf, dass die bakterielle Zelle auf Fe angewiesen ist, stellte aber auch eine Gefahr dar, da akkumuliertes Fe eine Toxizität zur Folge hat.

4.3.1.4 Transportsysteme

Zahlreiche Transportmechanismen waren durch *Dakapo* gehemmt. Nach der vorliegenden Analyse waren insgesamt 28 Transporter, u.a. die des Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferasesystems (PEP-PTS), inhibiert (Tab. 12). Für *L. monocytogenes* EGD-e werden insgesamt 86 Phosphotransferasesystem (PTS)-Gene beschrieben, wobei 29 für den Transport von Kohlenhydraten bedeutsam sind (Stoll & Goebel, 2010). Ebenso waren Gene runterreguliert, die wichtig für den Sulfatimport sind, wie *ItrC* (*Imo2398*) (-2,9↓), *Imo0524* (-2,4↓) und *Imo0994* (-2,1↓). Trotz reichhaltigen Angebots von Traubenextrakt im Medium schaltete die Zelle auf Energiesparmodus um, da die Substanzen nicht adäquat transportiert und verwertet werden konnten.

Tab. 12: Suppression von Transportmechanismen in *L. monocytogenes* (Wt) durch *Dakapo*

Gen	Protein	Potenzielle Funktion	Fold change
<i>lmo0641</i>	Schwermetalltransport-ATPase	Metallionentransport, ATP-Biosynthese, PTS	-5,8↓
<i>lmo0995</i>	<i>lmo0995</i> Protein	Acytransferase, ABC-Typ-Multidrug-Transportsystem	-5,2↓
<i>lmo0642</i>	<i>lmo0642</i> Protein	Transporter, PTS	-4,1↓
<i>lmo1300</i>	<i>lmo1300</i> Protein	Arsenit(Sandstein)transport	-3,9↓
<i>lmo0783</i>	<i>lmo0783</i> Protein	Zink-bindenden Dehydrogenase, PTS	-3,8↓
<i>lmo1422</i>	<i>lmo1422</i> Protein	Transportsystem, Multipassmembranprotein	-2,9↓
<i>lmo2398 (ltrC)</i>	Low temperature requirement C protein	Sulfat-/Thiosulfatimport, Lipidmetabolismus	-2,9↓
<i>lmo1241</i>	<i>lmo1241</i> Protein	ABC-Typ-AMP-Transportsystem	-2,9↓
<i>lmo0555</i>	<i>lmo0555</i> Protein	Oligopeptidtransport, Multipassmembranprotein	-2,7↓
<i>lmo0524</i>	<i>lmo0524</i> Protein	Sulfattransporter	-2,4↓
<i>lmo2602</i>	<i>lmo2602</i> Protein	Zinktransporter, Membranprotein	-2,4↓
<i>lmo0819</i>	<i>lmo0819</i> Protein	Putrescinttransport	-2,3↓
<i>lmo0593</i>	<i>lmo0593</i> Protein	Transporter	-2,3↓
<i>lmo2441</i>	<i>lmo2441</i> Protein	Transporter, PTS	-2,3↓
<i>lmo1694</i>	<i>lmo1694</i> Protein	ABC-Typ-Mangan-Transporter	-2,2↓
<i>lmo0405</i>	<i>lmo0405</i> Protein	Transporter, PTS	-2,2↓
<i>lmo2695</i>	<i>lmo2695</i> Protein	PTS-Transportsystem, Glycerolmetabolismus	-2,2↓
<i>lmo2697</i>	<i>lmo2697</i> Protein	Transporter, PTS	-2,2↓
<i>lmo0782</i>	<i>lmo0782</i> Protein	Transporter, PTS	-2,1↓
<i>lmo2259</i>	<i>lmo2259</i> Protein	Transporter, PTS	-2,1↓
<i>lmo0994</i>	<i>lmo0994</i> Protein	Zuckertransporter	-2,1↓
<i>lmo2733</i>	<i>lmo2733</i> Protein	PTS, DNA-Polymerase	-2,1↓
<i>lmo0795</i>	<i>lmo0795</i> Protein	Transporter	-2,0↓
<i>lmo2495</i>	Phosphate-transporting ATPase 1	ATP-Katabolismus, ABC-Phosphattransporter	-2,0↓
<i>lmo0648</i>	<i>lmo0648</i> Protein	Metallionentransporter	-2,0↓
<i>lmo1040</i>	<i>lmo1040</i> Protein	Multipassmembranprotein	-1,9↓
<i>lmo0013 (qoxA)</i>	AA3-600 quinol oxidase subunit II	Quinoloxidase, Multipassmembranprotein	-1,9↓
<i>lmo0912</i>	<i>lmo0912</i> Protein	Transporter	-1,9↓

4.3.1.5 Sonstige transkriptionelle Veränderungen

Enzyme der Zellwandsynthese wurden vermehrt exprimiert wie z.B. das Operon 155 mit *dltD* (*lmo0971*) (+4,6↑) und *dltB* (*lmo0973*) (+3,8↑), die für die D-Alaninveresterung der Lipoteichonsäuren und Zellwandteichonsäuren verantwortlich sind, sowie *dltA* (*lmo0974*) (+2,6↑), das mit seiner D-Alaninpoly(phosphoribitol)-Ligaseaktivität in den Lipoteichonsäure-Biosyntheseprozess involviert ist. *MurG* (*lmo2035*) (+2,4↑) kodiert für das in der Peptidoglykanbiosynthese involvierte Enzym, das den Transfer einer GlcNAc-Untereinheit auf das Undecaprenyl-pyrophosphoryl-MurNAc-Pentapeptid (Lipidintermediat I) katalysiert, um das Udecaprenyl-pyrophosphoryl-MurNAc-(pentapeptid)GlcNAc (Lipidintermediat II) zu bilden. *Lmo0540* (+2,5↑), ein Gen, das für das Penicillin-bindende Protein kodiert, war ebenso induziert. Andererseits waren Enzyme des Zellwandkatabolismus, wie *lmo0880* (-2,9↓) und *lmo0729* (-2,8↓) (lytische Mureintransglycosylase), runterreguliert. Diese Beobachtungen führten zu weiteren Untersuchungen der Sensitivität gegenüber verschiedenen Antibiotika nach Behandlung mit *Dakapo* (Kap. 4.5.7; Anhang A9). *Dakapo* schien keinen Einfluss auf das Virulenzpotenzial von *L. monocytogenes* zu haben, da das Virulenzgencluster mit

den Genen *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* und *plcB* (*lmo0200* bis *lmo0205*) keine Veränderung in der Transkription nach Behandlung mit *Dakapo* zeigte. Eine veränderte Expressionsrate hatte lediglich das *inlB*-Gen (*lmo0434*) (+2,0↑), das für das Oberflächenprotein Internalin B kodiert.

4.3.2 Einfluss von *Dakapo* auf das Wachstum des enteroaggregativen-hämorrhagischen *E. coli* (EAHEC, 2011)

Zur Untersuchung der Wachstumsförderung von EAHEC (2011) (ST3305, Gießen) durch *Dakapo* wurden die Bakterien bei 37 °C über einen Zeitraum von drei Stunden im Kolben in LB-Flüssignährmedium (*lysogeny broth*) (10 ml) mit und ohne *Dakapo* (77 µM) kultiviert und die OD₆₀₀ gemessen (ohne *Dakapo*: OD₆₀₀ 3,71; mit *Dakapo*: OD₆₀₀ 4,15). Es zeigte sich, im Gegensatz zur bräunlichen Verfärbung bei *L. monocytogenes* (Abb. 27), eine grünliche Verfärbung des Mediums (Abb. 32).

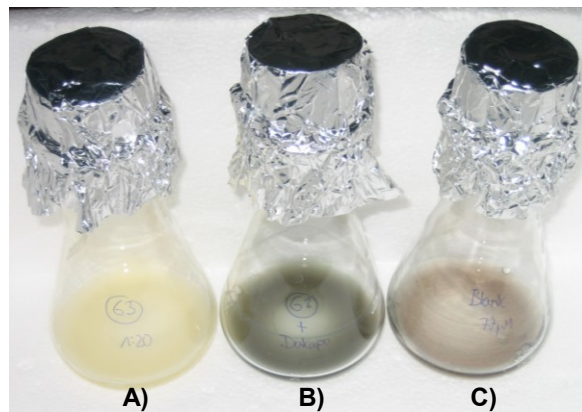


Abb. 32: EAHEC nach Kultivierung mit *Dakapo*, drei Stunden, 37 °C

Kultur im 100 ml Kolben, befüllt mit je 10 ml. **A:** EAHEC (ST3305, Gießen) unbehandelt in LB-Nährmedium. **B:** EAHEC (ST3305, Gießen) in LB-Nährmedium + *Dakapo* (77 µM). **C:** Leerwert: LB-Nährmedium + *Dakapo* (77 µM).

Die Konzentration der isolierten RNA (EAHEC ohne *Dakapo*: 459,1 ng/µl; EAHEC mit *Dakapo* (77 µM): 1229,8 ng/µl) (Anhang A6) und die Qualität der anschließend isolierten RNA war in beiden Proben sehr gut (Anhang A7) (Erläuterung zum RIN 3.2.8.2) (Schroeder et al., 2006).

Analog wie in Kap. 4.3.1 beschrieben, wurden die Transkriptomdaten ausgewertet, wobei der Stamm EAHEC S102644 (Frankfurt) (Genom unveröffentlicht) als Referenz verwendet wurde. Für die weitere Analyse wurden nur Gene mit einem *fold change* von $\leq -1,9$ bzw. $\geq +1,9$ und mindestens 10 *reads* betrachtet. Danach wurden durch *Dakapo* lediglich 6 % (294 Gene) der gesamten 5.276 Gene reguliert, wobei das Verhältnis von hoch- bzw. runterregulierten Genen gegenläufig zu dem von *L. monocytogenes* EGD-e (Wt) war (Abb. 28; Tab. 13). Von den regulierten Genen waren bei der EAHEC-Analyse 199 Gene vermindert und 95 Gene vermehrt exprimiert (Abb. 33). Eine Auflistung der analysierten Gene befindet sich im Anhang A13.

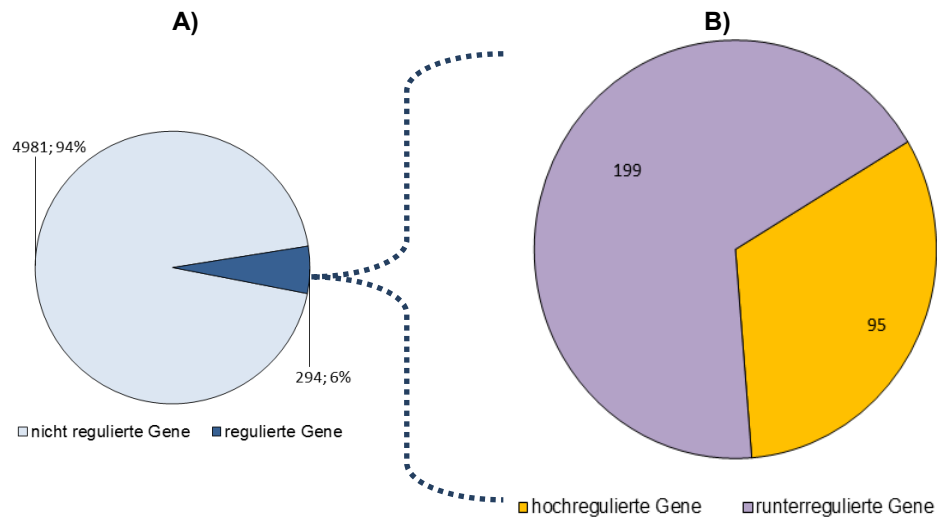


Abb. 33: Änderung der Genexpression in EAHEC durch *Dakapo*

In EAHEC (ST3305, Gießen) waren von 5.276 Genen, 294 (= 6 %) durch die *Dakapo*-Behandlung reguliert (Kriterien: mindestens 10 *reads*, *fold change*: $\leq -1,9$ bzw. $\geq +1,9$) (A). Unter diesen Kriterien waren 95 Gene hoch- und 199 Gene runterreguliert (B).

Nach Kategorisierung der regulierten Gene mittels Informationen aus verschiedenen Datenbanken (Pubmed; UniProt, 2013; Keseler et al., 2011) zeigte sich insbesondere eine Hochregulierung von Genen des Eisenaufnahmesystems (Siderophore) wie Enterobaktin, Aerobaktin und Yersiniabaktin und von anderen Transportsystemen (Abb. 34). Auffällig runterreguliert waren Gene des Eisendicitrattransportes und der Eisenspeicherung (Abb. 35).

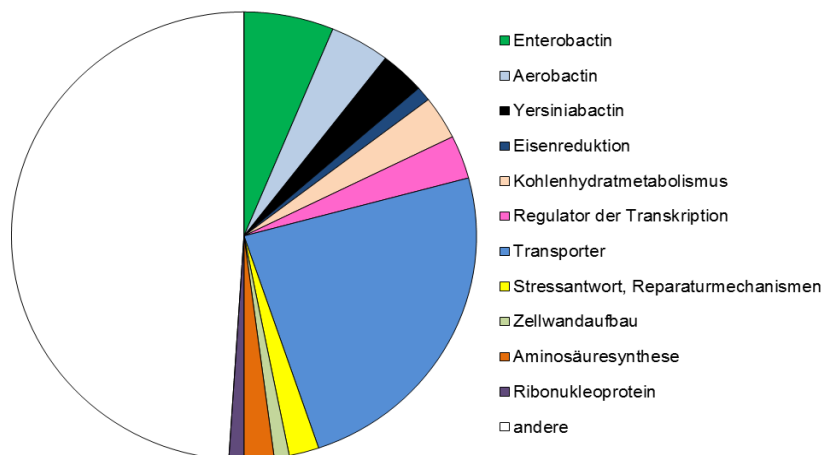


Abb. 34: Kategorisierung der durch *Dakapo* (77 µM) induzierten Gene in EAHEC

Die Einteilung in Kategorien erfolgte anhand von Informationen aus den Datenbanken UniProt (2013), GECO (Kuenne et al., 2007) und Pubmed. Dabei wurden nur Gene beachtet, die den Kriterien „mindestens 10 *reads*, *fold change*: $\leq -1,9$ bzw. $\geq +1,9$ “ entsprachen.

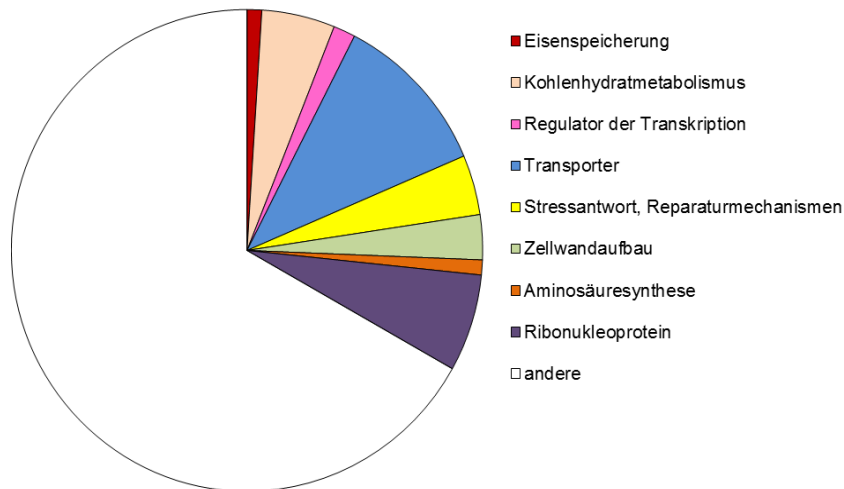
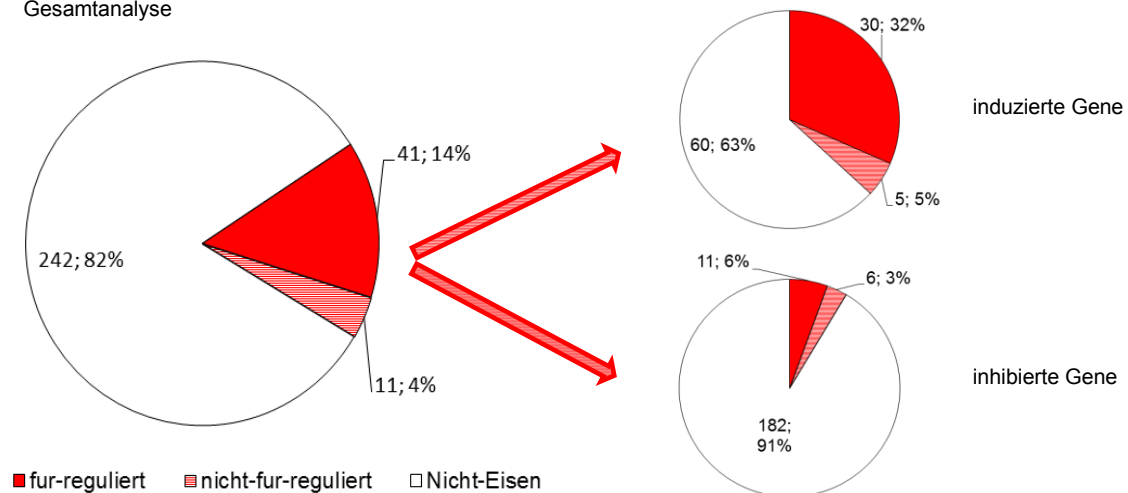


Abb. 35: Kategorisierung der durch *Dakapo* (77 µM) inhibierten Gene in EAHEC

Die Einteilung in Kategorien erfolgte anhand von Informationen aus den Datenbanken UniProt (2013), GECO (Kuenne et al., 2007) und Pubmed. Dabei wurden nur Gene beachtet, die den Kriterien „mindestens 10 reads, fold change: $\leq -1,9$ bzw. $\geq +1,9$ “ entsprachen.

Allgemein war die Expression zahlreicher Gene der Eisenhomöostase bzw. solcher, die für eisenhaltige Proteine kodieren, verändert. Zahlreiche dieser Gene werden durch das Gen *fur*, das für den ferric uptake regulator, einem Eisen-abhängigen Repressor der globalen Eisenhomöostase kodiert, reguliert (Abb. 36; Anhang A13). Wird der fold change bei $\leq -3,0$ bzw. $\geq +3,0$ gesetzt, zeigt sich, dass unter diesen Kriterien fast die Hälfte aller Gene am Eisenstoffwechsel beteiligt sind. Besonders auffallend waren dabei die enormen Veränderungen bei den hochregulierten Genen, da 83 % der induzierten Gene mit der Eisenhomöostase in Verbindung standen, im Vergleich zu lediglich 17 % der runterregulierten Gene (Abb. 36B).

A) Fold change $\leq -1,9$ bzw. $\geq +1,9$
Gesamtanalyse



B) Fold change $\leq -3,0$ bzw. $\geq +3,0$
Gesamtanalyse

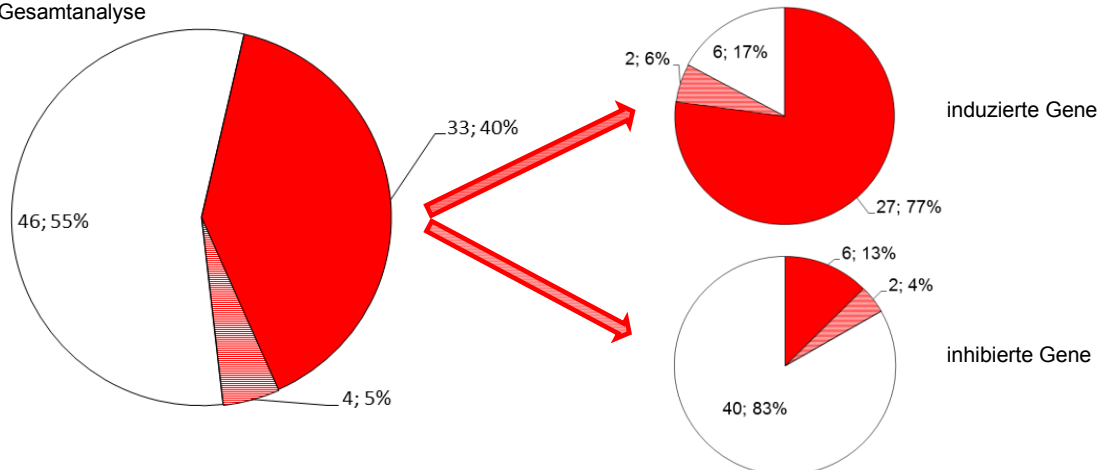


Abb. 36: Anteil der durch *Dakapo* regulierten, am Eisenmetabolismus beteiligten Gene

Unter den gesetzten Kriterien „mindestens 10 reads, fold change: $\leq -1,9$ bzw. $\geq +1,9$ “ waren von den insgesamt 5.276 Genen 52 (=18 %) *fur*- und nicht-*fur*-regulierte Gene am Eisenstoffwechsel beteiligt (Eisentransport, -speicherung, -reduktion) oder kodierten für eisenhaltige Proteine. Bei den induzierten Genen waren 35 (=37 %) *fur*- und nicht-*fur*-regulierte Gene von 95 Genen im Eisenmetabolismus involviert, bei den inhibierten Genen 17 (=9 %) von 199 Genen (A). Durch Änderung des fold changes auf $\leq -3,0$ bzw. $\geq +3,0$ wurde die enorme Regulierung der Eisenhomöostase durch *Dakapo* noch deutlicher (B).

4.3.2.1 Metabolische Genexpression

Anders als bei *L. monocytogenes* EGD-e (Wt) war in EAHEC keine Stimulation von Glukosidasen durch *Dakapo* zu finden. Lediglich ein Gen, das für eine α -Galaktosidase kodiert, war hochreguliert (+2,3 \uparrow). Es gab Hinweise, dass der Kohlenhydratmetabolismus streng kontrolliert ablief. Die Hochregulierung der Expression der 6-Phosphofruktokinase class II (+2,1 \uparrow), die den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Glykolyse (Fruktose-6-phosphat \rightarrow Fruktose-1,6-bisphosphat) katalysiert, bestimmt entscheidend, wie viel Energie (ATP, Citrat, NADH/H⁺) der Zelle zur Verfügung steht. Gleichzeitig waren die

Succinatdehydrogenase-Cytochrom b-556-Subunit (-3,4↓), und die Succinatdehydrogenase-Subunit D (-2,1↓), (beide eisenhaltig) (Oxidation Succinat → Fumarat; Reduktion Ubichinon → Ubichinol) runterreguliert. Es schien eine optimale, streng kontrollierte Kohlenhydratmetabolisierung stattzufinden, die der Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies entgegenwirkte.

4.3.2.2 Stressantwort und DNA-Reparatur

Oxidativer Stress wurde durch die starke Hochregulierung der Mangan- (+3,0↑) und der Kupfer-Zink-abhängigen Superoxiddismutasen (+2,3↑) abgefangen, während die Fe-abhängige Superoxiddismutase runterreguliert war (-2,9↓). Proteine der Stressantwort, wie ein nicht näher charakterisiertes Chaperonin (-6,4↓) sowie die Kälteschockproteine CspC (-4,3↓), CspE (-3,8↓) und CspA (-2,6↓) waren runterreguliert.

4.3.2.3 Eisenspeicherung

Die beiden Eisenspeicherproteine Ferritin-like Protein 2 (-5,5↓) und Bacterioferritin (-5,0↓) waren auffällig runterreguliert (Abb. 35), was darauf hindeutet, dass Fe zwar über die Siderophore aufgenommen wurde. Nach Reduktion durch die stark hochregulierte Ferrireduktase (*fhuF*) (+9,0↑) wurden die Metallionen jedoch zum Wachstum verwendet, so dass es in der Bakterienzelle nicht zu einer Eisenakkumulation kam.

4.3.2.4 Transportsysteme

Auffällig war die Hochregulierung von in Eisentransportsystemen involvierten Genen. Für Siderophore mit unterschiedlichen Strukturen kodierende Gene wie für Enterobaktin (Triccatecholstruktur) *fepA* (+23,0↑), *entF* (+21,4↑), *entE* (+17,7↑), *entA* (+14,5↑) und *fepB* (+5,7↑) waren stark induziert, ebenso wie Gene für Aerobaktin (Mixed-type Citrat-Hydroxamat) *iucA* (+7,0↑), *iucB* (+5,8↑), *iucD* (+4,7↑) oder Yersiniabaktin (Carboxylattyp) *fyuA* (+6,6↑) und *irp2* (+3,1↑), die beide nicht in *E. coli* MG1655 exprimiert werden (Abb. 37; Anhang A13.1). In Abb. 37 sind dabei die Ergebnisse der Transkriptomanalyse dargestellt, wobei die Funktionen der einzelnen Gene in der Literatur beschrieben sind (Garénaux et al., 2011).

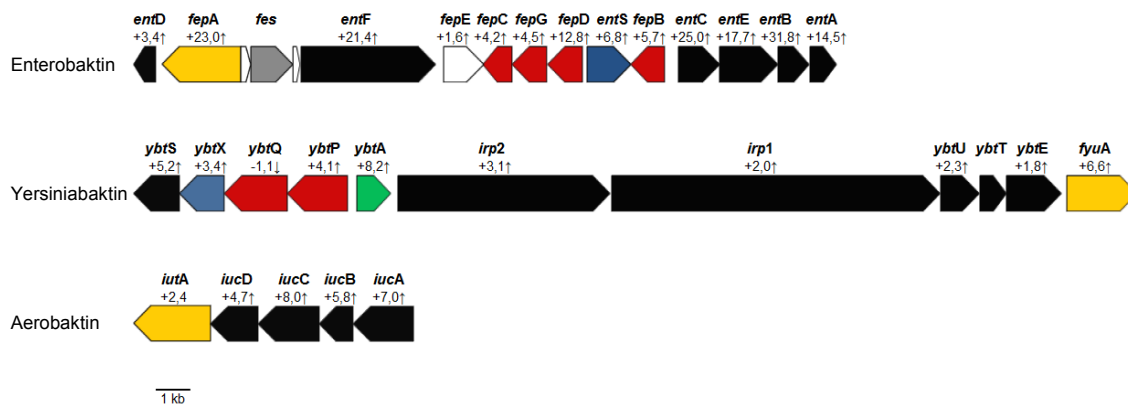


Abb. 37: Gencluster für Siderophore in EAHEC

Gencluster der relevanten Siderophore in EAHEC. Angabe der *fold changes* im Transkriptomexperiment mit EAHEC (ST3305, Gießen) nach Behandlung mit *Dakapo* (77 μ M). Legende: +↑ hochreguliert; -↓ runterreguliert durch *Dakapo*-Behandlung. Farben geben die Funktion der Gene an: Gene für Produkte der Biosynthese (schwarz), Export (blau), Rezeption (gelb), Internalisierung (rot) und Abbau (grau) der Siderophore (eigene Darstellung, in Anlehnung an Garénaux et al., 2011).

Ebenso war eine Hochregulierung weiterer Transporter/Rezeptoren für Fe zu verzeichnen, wie *cir* (Colicin I receptor precursor) (+9,0↑), *tonB* (Ferric siderophore transport system, periplasmic binding protein TonB) (+6,1↑), *fhuA* (Ferric hydroxamate outer membrane receptor FhuA) (+4,7↑) oder *fhuD* (Ferric hydroxamate ABC transporter periplasmic substrate binding protein FhuD) (+3,0↑). Im Gegensatz dazu war der Fe-III-Dicitrattransport stark eingeschränkt, da *fecA* (-5,1↓), *fecC* (-4,6↓), *fecD* (-4,5↓), *fecB* (-4,2↓) und *fecE* (-2,1↓) vermindert exprimiert wurden (Mahren et al., 2005).

Transporter des PTS-Systems, wobei für *E. coli* 38 verschiedene PTS-Proteine beschrieben werden, schienen durch *Dakapo* nicht stark beeinflusst zu werden mit Ausnahme der Runterregulierung des Phosphoenolpyruvat-abhängigen Phosphotransferaseenzym II für Cellobiose, Arbutin und Salicin (-2,2↓) (Siebold et al., 2001). Das wiederum deutet darauf hin, dass von Anthocyanen abgespaltene Zucker langsam und kontrolliert in die Zelle transportiert wurden. Andererseits war eine Induktion anderer Transporter, wie Blei-Cadmium-Zink-Quecksilber-transportierende ATPase/Kupfer-transportierende-P-type ATPase (+2,5↑) und des Hexosephosphattransportproteins UhpT (+2,2↑) festzustellen.

4.3.2.5 Sonstige transkriptionelle Veränderungen

Die starken Alternanzen im Eisenmetabolismus zeigte auch die extreme Induktion von *fhuF* (+9,0↑), das für die Eisenreduktase kodiert. Fe wurde als Fe^{3+} in die Zelle transportiert, anschließend reduziert und stand der Zelle zur Verfügung. Die Hochregulierung der Phosphoadenylylsulfatreduktase (Thioredoxin) (+2,1↑), deutete auf eine vermehrte Schwefelassimilation hin. Andererseits waren verschiedene Ribonukleoproteine verstärkt runterreguliert (Abb. 35).

4.4 Verifizierung der Transkriptomanalyse bei *L. monocytogenes* und EAHEC mittels qRT-PCR

Von der isolierten RNA wurde nach Umschreibung in cDNA eine quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) von selektierten Genen zur Kontrolle durchgeführt. Diese verifiziert die detektierten Tendenzen der Transkriptomanalysen (Abb. 38; Abb. 39).

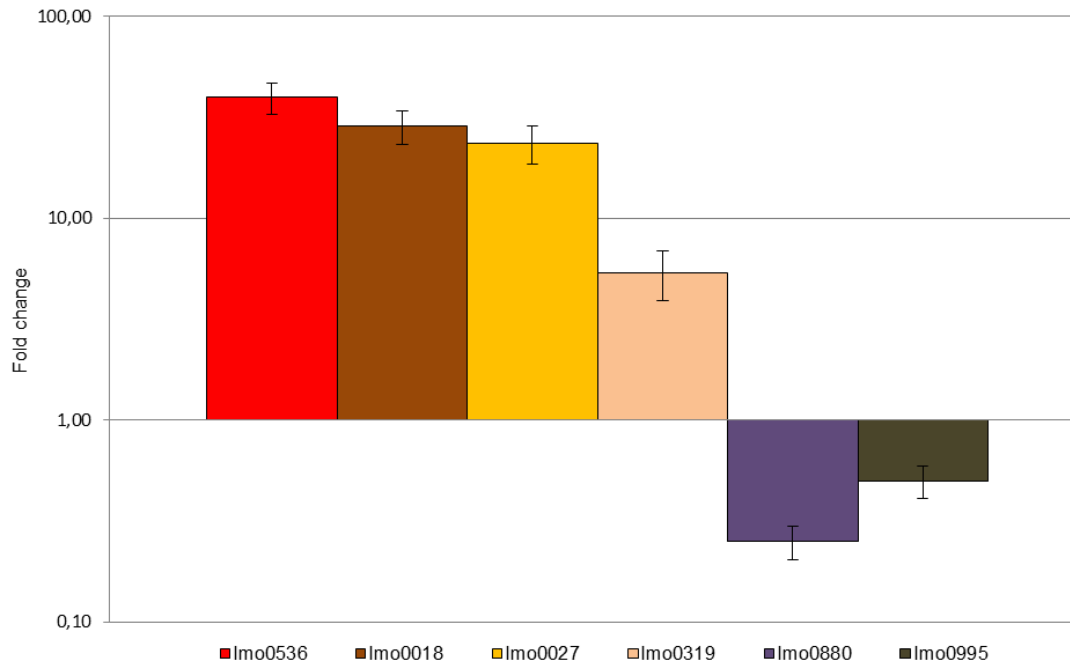


Abb. 38: qRT-PCR mit ausgewählten Genen von *L. monocytogenes* (Wt)

Primereffizienz-korrigierte relative Quantifizierung mittels qRT-PCR. Der *fold change* der Gene wurde auf das gewählte Referenzgen *sigB* (mit *fold change* von 1,0 in der Transkriptomanalyse) bezogen.

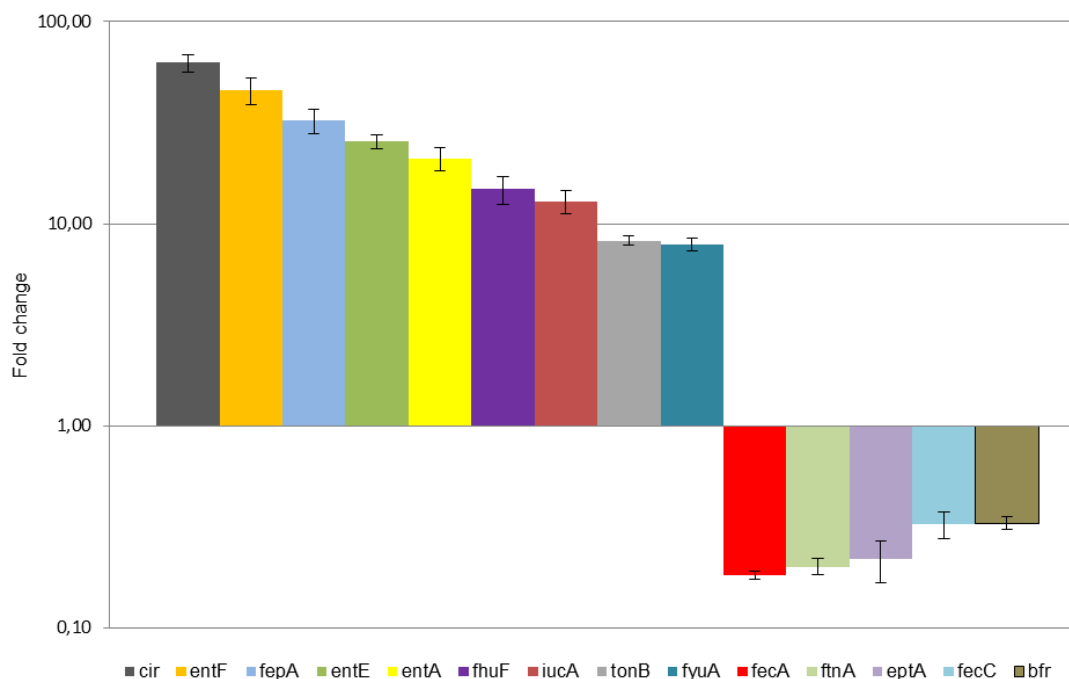


Abb. 39: qRT-PCR mit ausgewählten Genen von EAHEC

Primereffizienz-korrigierte relative Quantifizierung mittels qRT-PCR mit EAHEC (ST3305, Gießen). Der *fold change* der Gene wurde auf das gewählte Referenzgen *gpsA* (mit *fold change* von 1,0 in der Transkriptomanalyse) bezogen.

4.5 Mechanismen für die Wachstumsinhibition durch *Dakapo* in *L. monocytogenes*

4.5.1 Beta-Glukosidase-Assay

Der Nachweis der β -Glukosidase-Aktivität in *L. monocytogenes* EGD-e (Wt) nach Zugabe von *Dakapo* erfolgte durch Umsetzung des Substrates 4-Nitrophenyl- β -D-glukopyranosid. Dabei bestätigte sich die signifikant erhöhte Aktivität der β -Glukosidasen ($***p<0,005$). Das Substrat wurde vermehrt umgesetzt, woraus ein gelber Farbumschlag resultierte, dessen relative Intensität durch Messung der OD₄₂₀ nach 30 Minuten Inkubation mit 4-Nitrophenyl- β -D-glukopyranosid ermittelt werden konnte (Abb. 40).

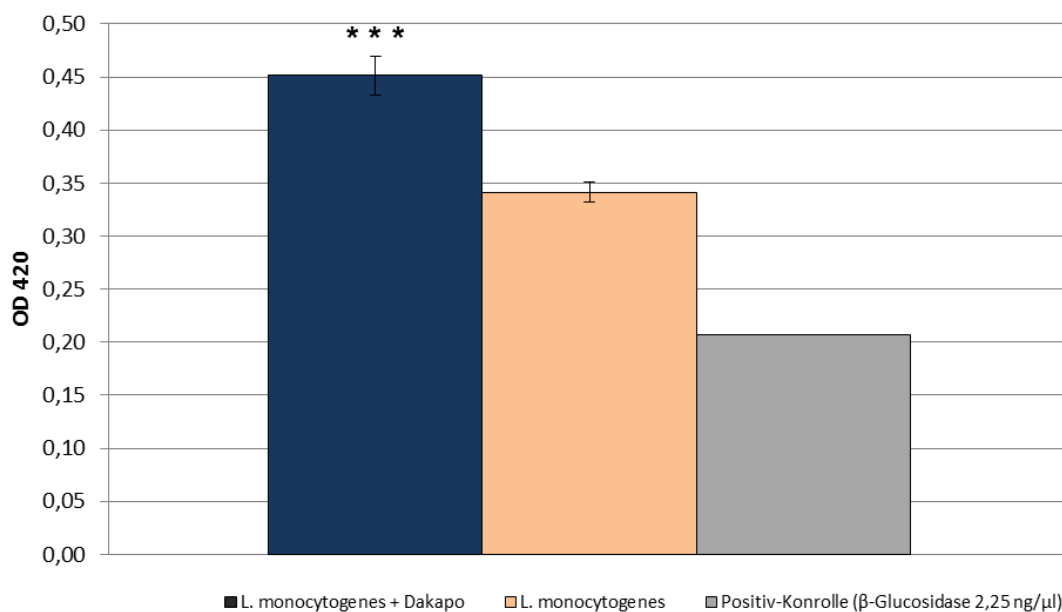


Abb. 40: Aktivität der β -Glukosidasen in *L. monocytogenes* (Wt) nach Inkubation mit *Dakapo*

L. monocytogenes EGD-e (Wt) wird 3 Std. 30 Min. mit und ohne *Dakapo* (Endkonzentration: 77 μ M) im Kolben kultiviert. Nach einem Waschschrift wurde das Bakterienpellet mit dem Substrat 4-Nitrophenyl- β -D-Glukopyranosid versetzt und inkubiert (37 °C). Die Messung der OD₄₂₀ erfolgte nach 30 Min. Als Positivkontrolle wurde 2,25 ng/ μ l β -Glukosidase aus *Caldocellum saccharolyticum* eingesetzt. Die enzymatische Aktivität der β -Glukosidasen war durch die *Dakapo*-Behandlung signifikant erhöht ($***p<0,005$).

4.5.2 Effekt von Sauerstoff auf die *Dakapo*-Wirkung

Anaerobe Kultivierung schwächte den hemmenden Effekt von *Dakapo* in *L. monocytogenes* EGD-e (Wt) ab. Die Δ sodA-Mutante wuchs sowohl aerob als auch anaerob schlechter als der Wt (Abb. 41A). Auf mit *Dakapo*-beschichteten (77 μ M) Agarplatten wuchsen beide Stämme anaerob besser als aerob (Abb. 41B,C). Sauerstoff schien den inhibitorischen Effekt von *Dakapo* zu verstärken. Das bestätigte die Annahme des durch Kohlenhydratmetabolismus induzierten, oxidativen Stresses.

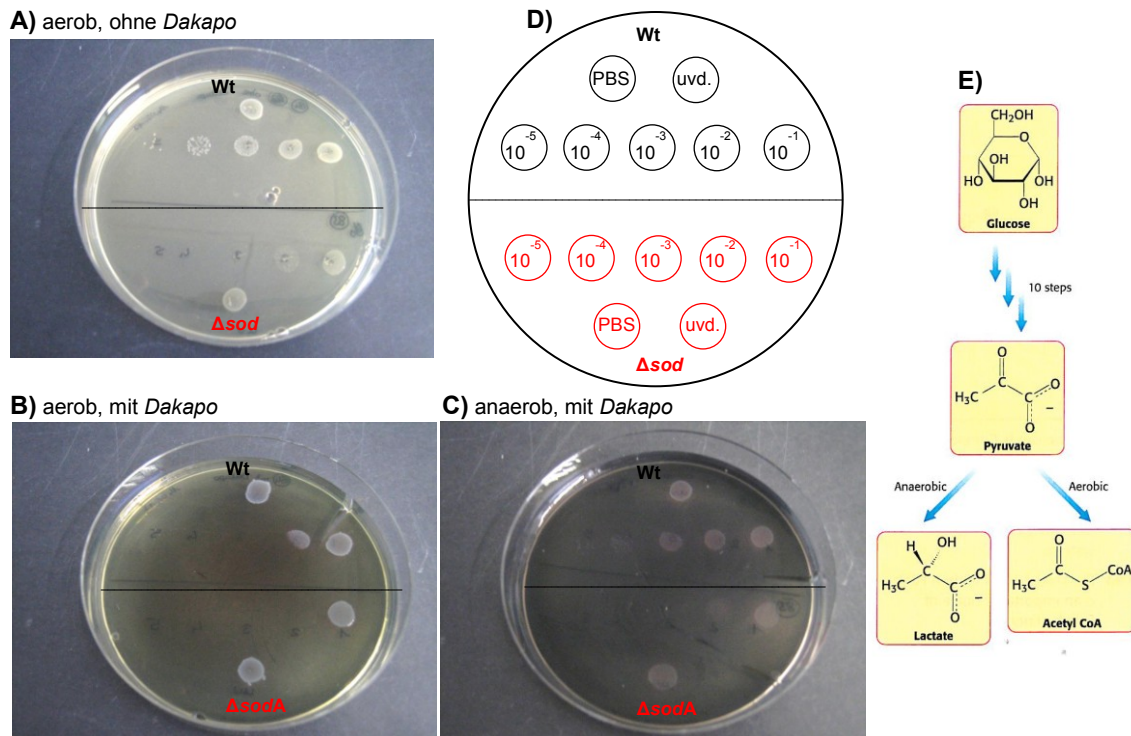


Abb. 41: Abschwächung des inhibitorischen Effektes von *Dakapo* bei anaerobem Wachstum

Eine 1:10-Verdünnungsreihe von *L. monocytogenes* EGD-e (Wt) bzw. Δ sodA wurde auf BHI-Agarplatte nach Schema getropft (jeweils obere Hälfte der Agarplatte *Listeria monocytogenes* EGD-e (Wt), untere Hälfte Δ sodA) (D). Bei B und C wurden die BHI-Agarplatten zuvor mit *Dakapo* (Endkonzentration: 77 μ M) beschichtet. Die Inkubation erfolgte aerob (A,B) und im Anaerobiertopf (C) für 16 Std. bei 37 °C. Die Δ sodA-Mutante wuchs schlechter als der Wt. Auf der mit *Dakapo* beschichteten Agarplatte wuchsen beide Stämme schlechter. Der Vergleich der aeroben (B) mit anaeroben (C) Bedingungen zeigte, dass beide Stämme auf *Dakapo*-beschichteten Platten anaerob besser wuchsen als aerob. Aerob wird Glukose zu Acteyl-CoA abgebaut, gefolgt vom Citratzyklus und der Atmungskette (Radikalbildung), anaerob zu z.B. Lactat (Berg et al., 2012) (E) (uvd. = unverdünnt).

4.5.3 Effekt unterschiedlicher Kohlenhydratquellen im Minimalmedium

Verschiedene Kohlenhydratquellen im Minimalmedium (MM) zeigten, dass der Zuckerabbau via Citratzyklus und Atmungskette zu oxidativem Stress und Wachstumshemmung führte. *L. monocytogenes* EGD-e (Wt) wuchs schlechter in MM (Premaratne et al., 1991) mit Glycerin (1 %) anstelle von Glukose (1 %). Durch eine *Dakapo*-Supplementation (77 μ M) konnten die Bakterien im Glukose-haltigen MM allerdings nicht mehr wachsen, während das Wachstum im mit Glycerin-angereichertem MM lediglich verschlechtert war (Abb. 42).

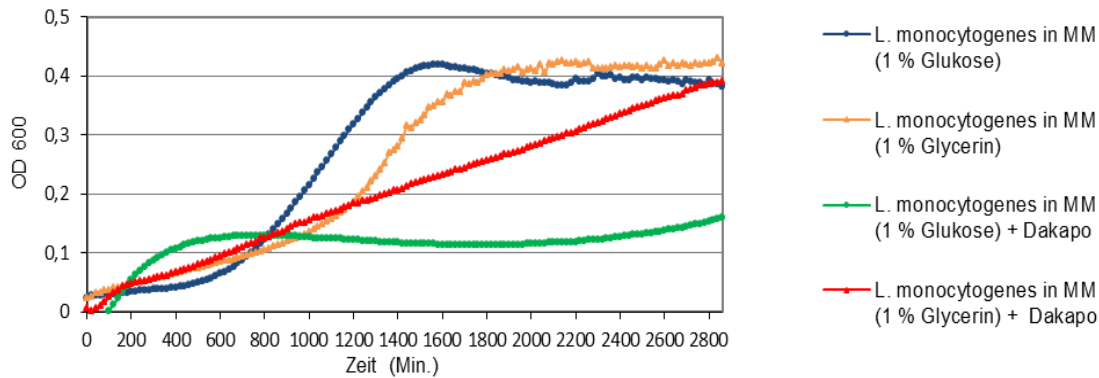


Abb. 42: Effekt von *Dakapo* auf das Wachstum von *L. monocytogenes* (Wt) im MM mit verschiedenen Kohlenhydratquellen

MM wurde hergestellt (gemäß Premaratne et al., 1991) wobei als Kohlenhydratquelle 1 % Glukose oder 1 % Glycerin zugesetzt wurden. Eine ÜNK von *L. monocytogenes* EGD-e (Wt) wurde 1:20 in den Wells der Mikrotiterplatte mit Glukose- oder Glycerin-haltigem MM verdünnt. Nach Zugabe von *Dakapo* (77 µM) erfolgte die Messung der OD₆₀₀ alle 20 Min. im Mikrotiterplattenlesegerät über einen Zeitraum von 48 Std. In Glycerin-haltigem MM wuchs *L. monocytogenes* EGD-e (Wt) schlechter im Vergleich zum Glukose-haltigem MM. *Dakapo* führte zu einer Wachstumshemmung, allerdings war diese im Glukose-haltigen MM deutlich ausgeprägter als im Glycerin-haltigen MM.

4.5.4 Effekt von *Dakapo* auf das Wachstum verschiedener Mutanten

Beim Test verschiedener Mutanten mit *Dakapo* wurde ein entscheidendes Resultat mit der $\Delta mo1054$ -Deletionsmutante erzielt, da das Traubenextrakt gegenüber dieser schlechter als der Wt-wachsenden Deletionsmutante keinen inhibitorischen Effekt hatte (Abb. 43A). Das deletierte Gen der Mutante kodiert für das Pyruvatdehydrogenase-E2-Komponent (*pdh*), das in die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA zwischen Glykolyse und dem Citratzyklus involviert ist (Abb. 43B) (Kanehisa & Goto, 2000).

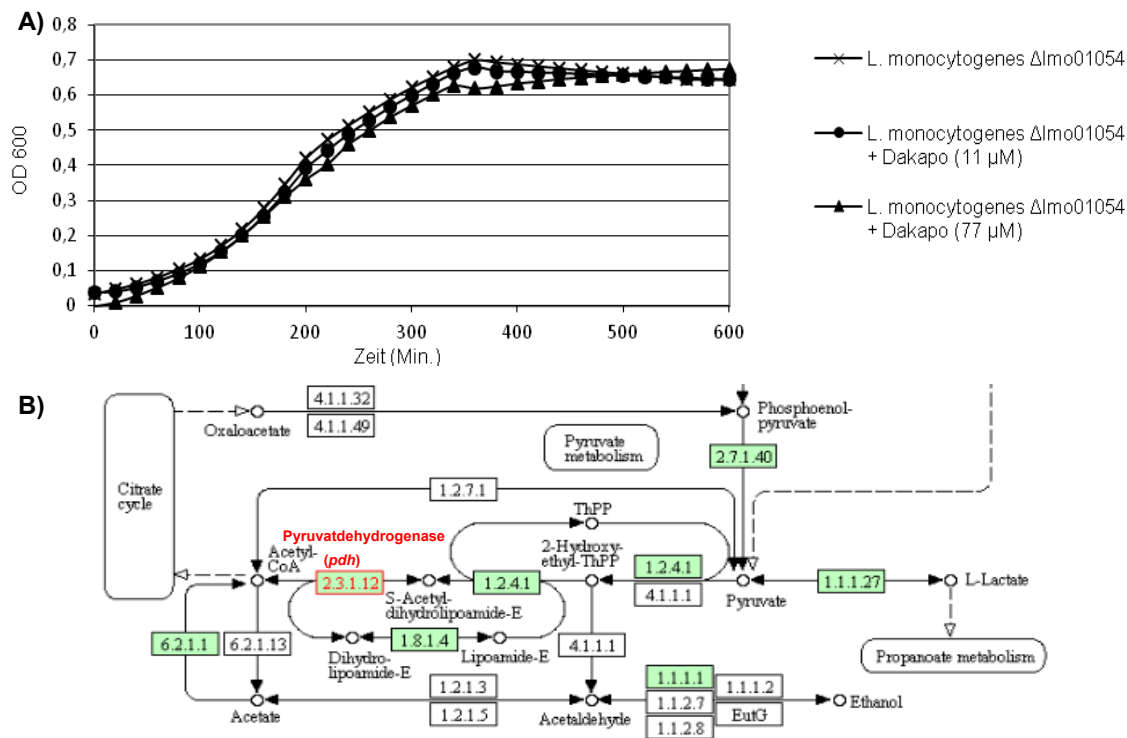


Abb. 43: Effekt von Dakapo auf das Wachstum der Δpdh -Deletionsmutante

Eine ÜNK von *L. monocytogenes* EGD-e (Wt) bzw. Δpdh -Mutante ($\Delta lmo01054$) wurde 1:20 in den Wells der Mikrotiterplatte mit BHI-Nährmedium verdünnt. Nach Zugabe von Dakapo (Endkonzentration: 77 μM) erfolgte die Messung der OD₆₀₀ alle 20 Min. im Mikrotiterplattenlesegerät. Das Traubenextrakt hatte keinen wachstumshemmenden Effekt auf die Δpdh -Mutante (A) (im Gegensatz zum Effekt von Dakapo im Wt (Abb. 11B)). Das Gen *pdh* kodiert für das Pyruvatdehydrogenase-E2-Komponent, das die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA zwischen Glykolyse und dem Citratzyklus katalysiert (B) (Kanehisa & Goto, 2000).

Die $\Delta sodA$ -Mutante wuchs deutlich schlechter im Vergleich zum Wt. Gegenüber dieser Mutante hatte Dakapo einen akkumulativen, inhibitorischen Effekt (Abb. 44).

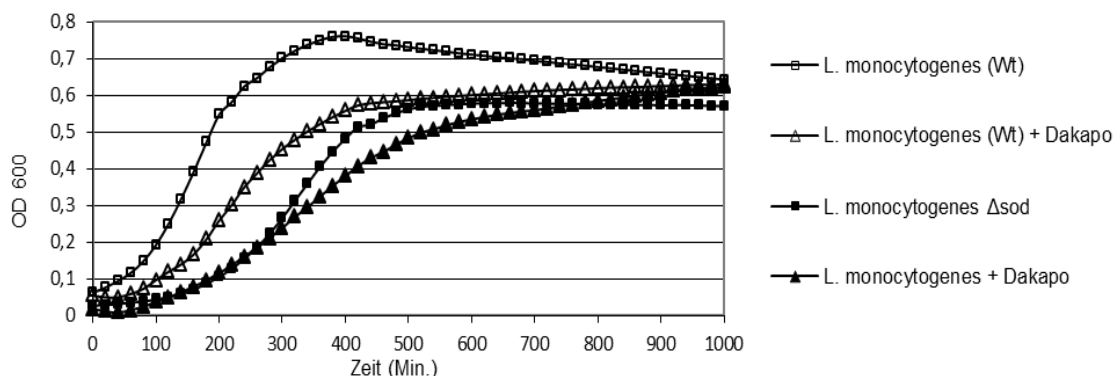


Abb. 44: Effekt von Dakapo auf das Wachstum der $\Delta sodA$ -Deletionsmutante

Eine ÜNK von *L. monocytogenes* EGD-e (Wt) bzw. der $\Delta sodA$ -Mutante ($\Delta lmo1439$) wurde 1:20 in den Wells der Mikrotiterplatte mit BHI-Nährmedium, verdünnt. Nach Zugabe von Dakapo (Endkonzentration: 77 μM) erfolgte die Messung der OD₆₀₀ alle 20 Min. im Mikrotiterplattenlesegerät. Die $\Delta sodA$ -Mutante wuchs schlechter als der Wt. Das Traubenextrakt hatte einen verhältnismäßig gleichen wachstumshemmenden Effekt auf die $\Delta sodA$ -Mutante wie auf den Wt.

Gegenüber weiteren getesteten Deletionsmutanten zeigte Dakapo den gleichen inhibitorischen Effekt wie im Wt ($\Delta lmo1580$, $\Delta lmo0415$, $\Delta lmo0610$, $\Delta lmo0880$, $\Delta lmo1364$ ($\Delta cspA$), $\Delta lmo2016$ ($\Delta cspB$), $\Delta lmo0263$ ($\Delta inlH$), $\Delta lmo0943$ (Δfri), $\Delta lmo0555$

($\Delta dtpT$), $\Delta lmo2673$, $\Delta lmo1978$ und $\Delta lmo0319$ ($\Delta bgl2$) (kodiert für eine der β -Glukosidasen) (Darbouche et al., 2012; Darbouche, 1996).

4.5.5 Untersuchungen zu oxidativem Stress

Das vermehrte Auftreten von DNA-Doppelstrangbrüchen und -Schäden durch *Dakapo*-Behandlung konnte mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) gezeigt werden. Die Kultivierung mit *Dakapo* mit 77 μM und im Überschuss mit 385 μM (fünffache Menge) führte zu deutlich breiteren Banden (Spuren 3 und 4) als der unbehandelte Ansatz (Spur 1) (Abb. 45).

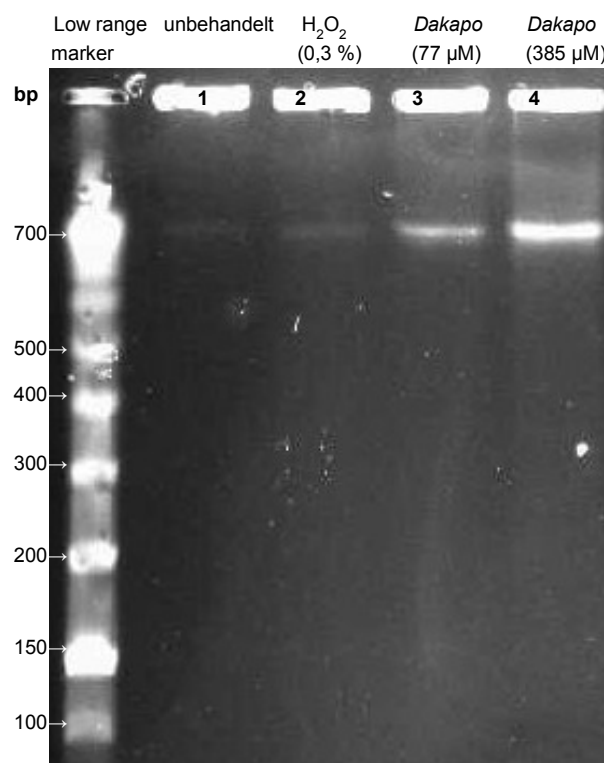


Abb. 45: Induktion von DNA-Schäden in *L. monocytogenes* (Wt) durch *Dakapo* (PFGE)

L. monocytogenes EGD-e (Wt) wurde 3 Std. 30 Min. im BHI-Nährmedium (37 °C, 180 rpm) mit und ohne *Dakapo* (77 μM bzw. 385 μM) oder H_2O_2 (0,3 %) kultiviert und in *Plugs* gegossen. Im PFGE-Gel (1 %) zeigten sich durch die *Dakapo*-Behandlung vermehrte DNA-Strangbrüche, angezeigt durch deutlich stärkere Banden (Spuren 3 und 4).

4.5.6 Effekt isolierter Anthocyane

Die in *Dakapo* enthaltenen Anthocyane Delphinidin-3-Glukosid (D-3-G) (mit Catecholstruktur) und Malvidin-3-Glukosid (M-3-G) (ohne Catecholstruktur) (Abb. 70) wurden isoliert gegen *L. monocytogenes* EGD-e (Wt) getestet. D-3-G hatte keinen nennenswerten Effekt auf das Wachstum des Wt. Dieses Anthocyan bildet mit Fe Komplexe. Andererseits inhibierte M-3-G, das keine Fe-komplexierenden Eigenschaften hat, das Wachstum vergleichbar mit dem Effekt der komplexen Substanz *Dakapo* (Abb. 46A). Gegenüber der *sodA*-Mutante führten beide Substanzen zu einer Wachstumshemmung, insbesondere M-3-G (Abb. 46B).

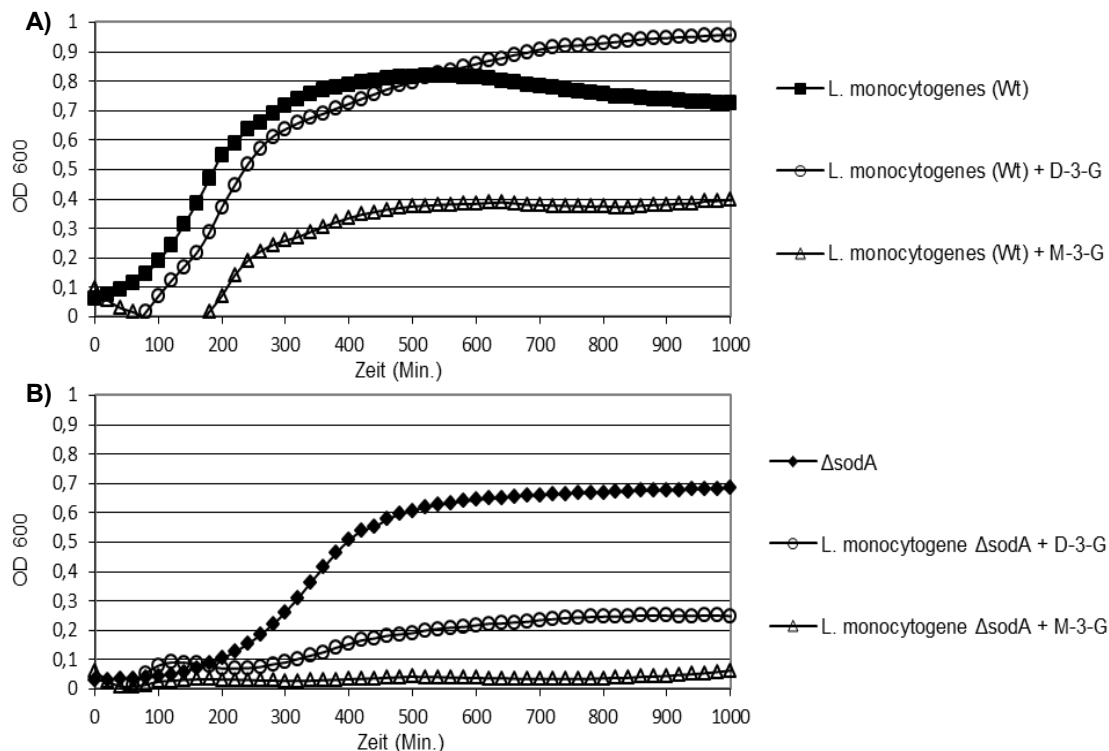


Abb. 46: Effekt von D-3-G und M-3-G auf das Wachstum von *L. monocytogenes* (Wt) und Δ sodA-Mutante

Eine ÜNK von *L. monocytogenes* EGD-e (Wt) bzw. der Δ sodA-Mutante (Δ lmo1439) wurde 1:20 in den Wells der Mikrotiterplatte mit BHI-Nährmedium verdünnt. Nach Zugabe von D-3-G (Fe-komplexierend) bzw. M-3-G (nicht-Fe-komplexierend) (Endkonzentration: jeweils 77 μ M) erfolgte die Messung der OD₆₀₀ alle 20 Min. im Mikrotiterplattenlesegerät. Gegenüber dem Wt hatte M-3-G einen hemmenden Effekt (A), in der Δ sodA-Mutante (Δ lmo1439) wirkten sowohl M-3-G als auch D-3-G wachstumsinhibierend (B).

Bei der *pdh*-Mutante (*lmo1054*) hoben sich die Effekte von D-3-G (Wachstumsinduktion) und M-3-G (Wachstumshemmung) nach 10 Stunden auf (Abb. 47A), was eine Erklärung für das Resultat mit *Dakapo* sein könnte (Abb. 43A). Gegenüber Δ lmo1978, das für die Glukose-6-phosphat-1-dehydrogenase kodiert (Pentosephosphatzyklus, β -D-Glukose-6-phosphat \rightarrow D-Glukono-1,5-lakton-6-phosphat), zeigte sich ein vergleichbarer Effekt der Substanzen wie beim Wt, bei dem nur M-3-G eine hemmende Wirkung aufwies (Abb. 47B; Abb. 46A).

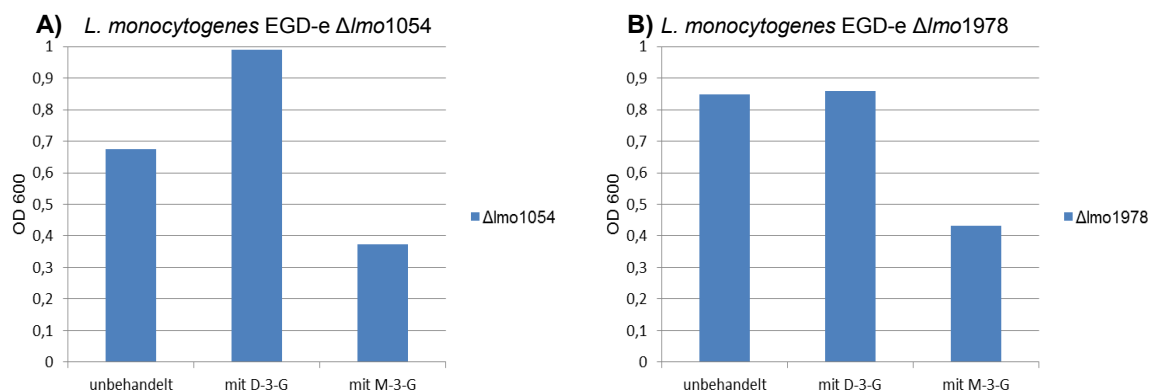


Abb. 47: Effekt von D-3-G und M-3-G auf Deletionsmutanten von *L. monocytogenes*

Eine ÜNK der Mutanten Δ lmo1054 und Δ lmo1978 von *L. monocytogenes* EGD-e wurde 1:20 in den Wells der Mikrotiterplatte mit BHI-Nährmedium verdünnt. Nach Zugabe von D-3-G (Fe-komplexierend) bzw. M-3-G (nicht-Fe-komplexierend) (Endkonzentration: jeweils 77 μ M) erfolgte die Messung der OD₆₀₀ alle 20 Min. über einen Zeitraum von 24 Std. im Mikrotiterplattenlesegerät. Nach 10 Std. Wachstum hatte D-3-G bei der Δ lmo1054-Mutante einen wachstumsstimulierenden, M-3-G einen -hemmenden Effekt (A). In der Δ lmo1978-Mutante zeigte nur M-3-G eine wachstumsinhibierende Wirkung (B).

4.5.7 Effekt einer Eisensupplementierung

Fe-III-Citrat (300 µg/ml) hatte keinen Effekt auf das Wachstum von *L. monocytogenes* EGD-e (Wt), aber der Einsatz dieser Eisenkonzentration in Kombination mit *Dakapo* verschlechterte das Wachstum deutlich (Abb. 48). Die Eisensupplementierung schien den durch *Dakapo* verursachten oxidativen Stress zu verstärken.

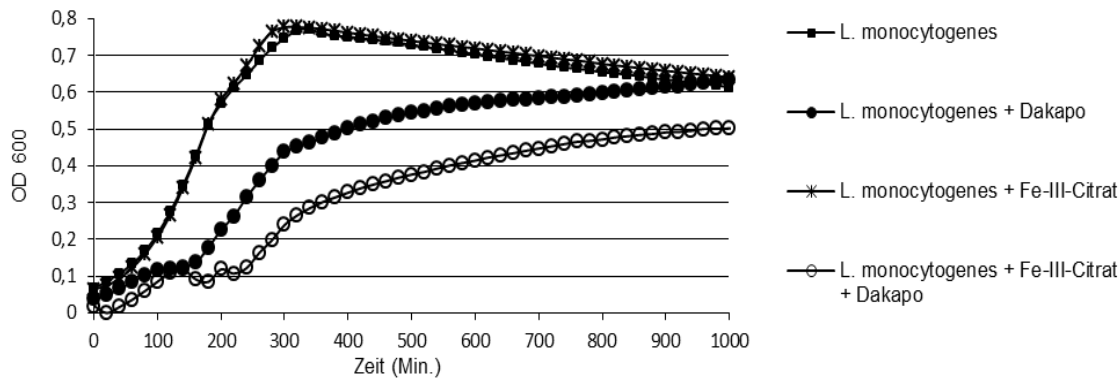


Abb. 48: Effekt von Fe-III-Citrat und *Dakapo* auf das Wachstum von *L. monocytogenes* (Wt)

Eine ÜNK von *L. monocytogenes* EGD-e (Wt) wurde 1:20 in den Wells der Mikrotiterplatte mit BHI-Nährmedium verdünnt. Nach Zugabe von *Dakapo* (Endkonzentration: 77 µM) und Fe-III-Citrat (Endkonzentration: 300 µM) erfolgte die Messung der OD₆₀₀ alle 20 Min. im Mikrotiterplattenlesegerät. Der hemmende Effekt des Traubenextraktes wurde durch die Eisensupplementierung verstärkt.

Der Test mit den Anthocyan-Substanzen zeigte, dass im Wt D-3-G und nicht M-3-G für diesen durch Fe potentierte, inhibierenden Effekt verantwortlich war, da nach 10 Stunden mit D-3-G-Fe-Supplementierung eine drastische Wachstumshemmung auftrat (Abb. 49A). Auf die beschriebene inhibitorische Wirkung von M-3-G (Abb. 46A) hatte Fe keinen Einfluss (Abb. 49B). Interessanterweise war Fe für die *sodA*-Mutante ein wachstumsstimulierender Faktor. Der wachstumshemmende Effekt von D-3-G und M-3-G gegenüber dieser Mutante (Abb. 46B) wurde durch Fe-III-Citrat kompensiert, woraus ein verbessertes Wachstum im Vergleich zu den unbehandelten Bakterien resultierte (Abb. 49C,D). Bei dieser Mutante ist die Bildung von H₂O₂ aus dem O₂•⁻ nicht möglich, was wiederum die durch Fe vermittelte Fenton-Reaktion verhindert.

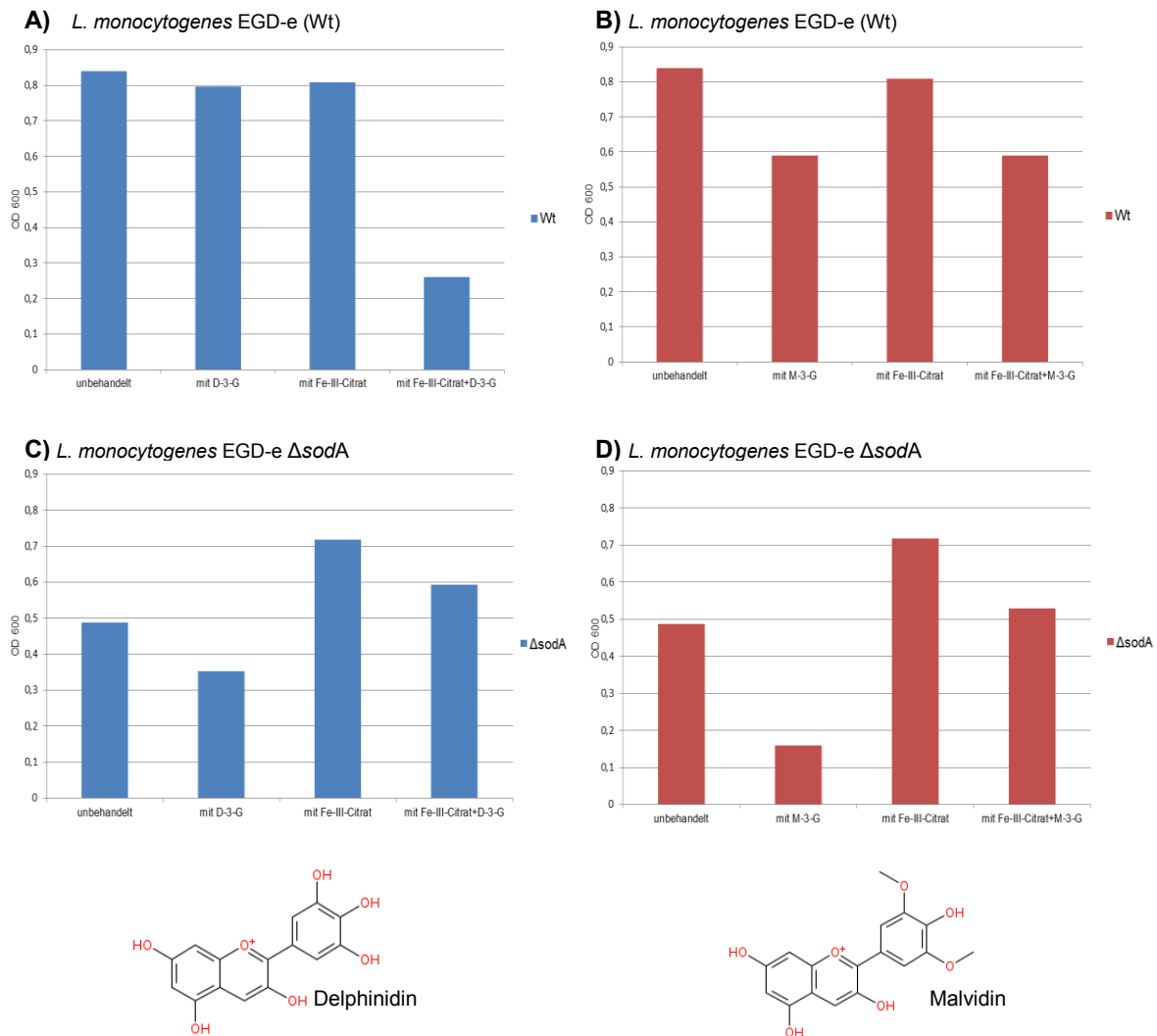


Abb. 49: Effekte von Fe-III-Citrat und isolierter Anthocyane auf das Wachstum von *L. monocytogenes*

Eine ÜNK von *L. monocytogenes* EGD-e (Wt) bzw. der *ΔsodA*-Mutante (*Δlmo1439*) wurde 1:20 in den Wells der Mikrotiterplatte mit BHI-Nährmedium verdünnt. Nach Zugabe von D-3-G (Fe-komplexierend) bzw. M-3-G (nicht-Fe-komplexierend) (Endkonzentration: jeweils 77 μM) oder/und Fe-III-Citrat (300 μM) erfolgte die Messung der OD₆₀₀ alle 20 Min. über einen Zeitraum von 24 Std. im Mikrotiterplattenlesegerät. Nach 10 Std. Wachstum hatte im Wt Fe-III-Citrat in Kombination mit D-3-G eine starke wachstumshemmende Wirkung, D-3-G alleine jedoch nicht (A). Auf den hemmenden Effekt von M-3-G hatte das Metall keine Auswirkungen (B). Für die *ΔsodA*-Mutante war Fe-III-Citrat ein Wachstumsfaktor, dessen Wirkung noch stärker ausgeprägt war, als der wachstumshemmende Effekt der Anthocyan-Einzelsubstanzen. Der Hemmeffekt der Anthocyan-Einzelsubstanzen wurde durch Fe-III-Citrat kompensiert (C,D).

4.5.8 Effekt von Catechol und verschiedenen Antibiotika

Aufgrund der Veränderungen von Zellwandproteinen (Kap. 4.3.1.5) wurde die Wirkung von *Dakapo* und Catechol auf die Suszeptibilität gegenüber verschiedenen Antibiotika untersucht. Catechol, eine Fe-bindende Struktur, ist Bestandteil verschiedener Anthocyane (Delphinidin, Cyanidin, Petunidin) und ein mögliches Abbauprodukt. Es zeigte sich nach Zugabe von *Dakapo* ein akkumulativer, inhibitorischer Effekt zur hemmenden Wirkung von subletalen Konzentration von Penicillin (0,05 μg/ml) (Abb. 50), Ciprofloxacin (1 μg/ml) und Nalidixinsäure (128 μg/ml), der allerdings bei den Proteinsynthesehemmern Gentamycin (1 μg/ml), Erythromycin 0,1 μg/ml) und Tetrazyklin (0,15 μg/ml) nicht festzustellen war (Anhang A9).

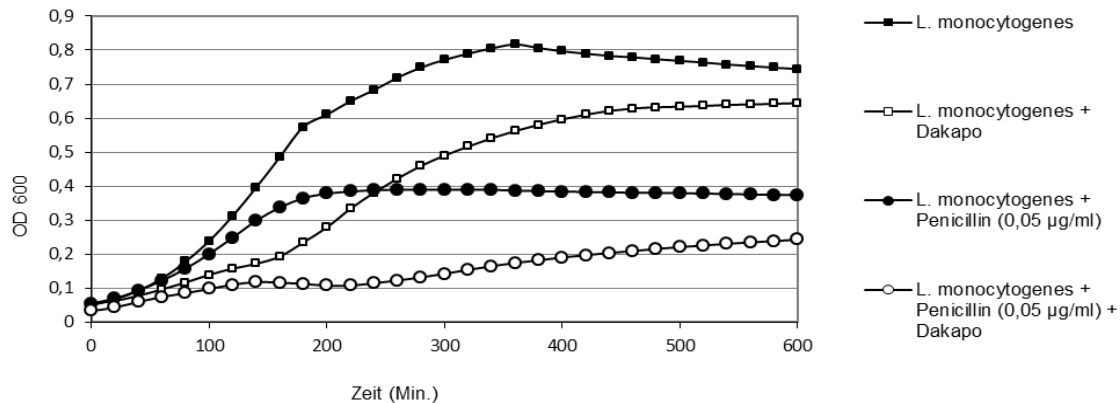


Abb. 50: Wirkung von *Dakapo* auf die Suszeptibilität gegenüber Penicillin

Eine ÜNK von *L. monocytogenes* EGD-e (Wt) wurde 1:20 in den Wells der Mikrotiterplatte mit BHI-Nährmedium verdünnt. Nach Zugabe von *Dakapo* (Endkonzentration: 77 µM) oder/und Penicillin (Endkonzentration: 0,05 µg/ml) wurde die OD₆₀₀ alle 20 Min. im Mikrotiterplattenlesegerät gemessen. *Dakapo* potenzierte den wachstumshemmenden Effekt des β-Laktam-Antibiotikums Penicillin. Die Ergebnisse des Tests mit weiteren Antibiotika sind im Anhang A9 dargestellt.

Catechol hatte einen konzentrationsabhängigen, inhibitorischen Effekt, was eine Erklärung für die wachstumshemmende Wirkung von *Dakapo* liefert, denn Catechol kann zu Acetyl-CoA abgebaut werden, das in den Citratzyklus gelangt (Caspi et al., 2012). Catechol (5 mM) hatte vergleichbare Effekte in Kombination mit Penicillin wie *Dakapo* (Abb. 51).

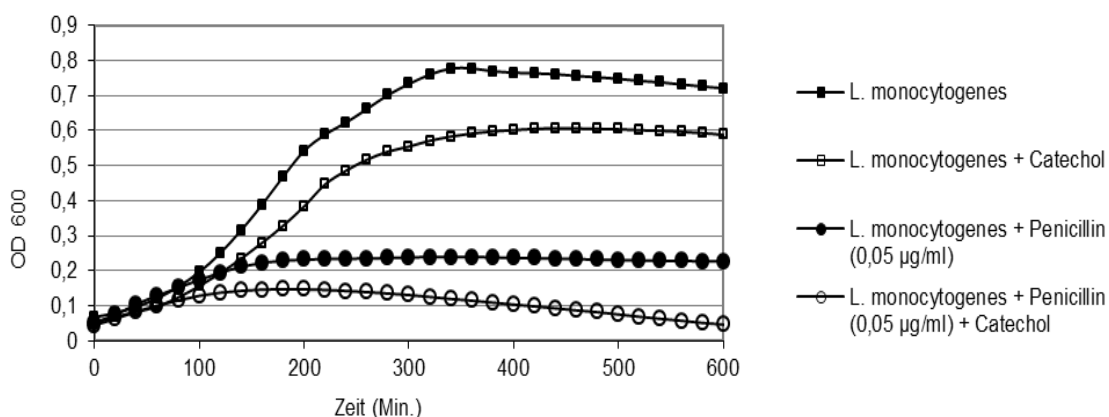


Abb. 51: Wirkung von Catechol auf die Suszeptibilität gegenüber Penicillin

Eine ÜNK von *L. monocytogenes* EGD-e (Wt) wurde 1:20 in den Wells der Mikrotiterplatte mit BHI-Nährmedium verdünnt. Nach Zugabe von Catechol (Endkonzentration: 5 mM) oder/und Penicillin (Endkonzentration: 0,05 µg/ml) wurde die OD₆₀₀ alle 20 Min. im Mikrotiterplattenlesegerät gemessen. Catechol potenzierte den wachstumshemmenden Effekt des β-Laktam-Antibiotikums Penicillin.

4.5.9 Wirkung des Peptides LL-37

Die erhöhte Expression des Operons 155 (*dltD*, *dltB*, *dltA*) (Anhang A12.1; Kap. 4.3.1.5) gab Hinweise, dass eine vermehrt positive geladene Zellwand durch die *Dakapo*-Behandlung vorlag. Daher wurde das kationische humane, α-helikale Peptid LL-37 (37 AS) aus der Gruppe der Cathelicidine in Kombination mit *Dakapo* getestet (Turner et al., 1998; Bulet et al., 2004; Zanetti, 2005). Die inhibitorische Wirkung des

Peptids wurde durch *Dakapo* nahezu aufgehoben bzw. durch den *Dakapo*-Effekt überdeckt (Abb. 52).

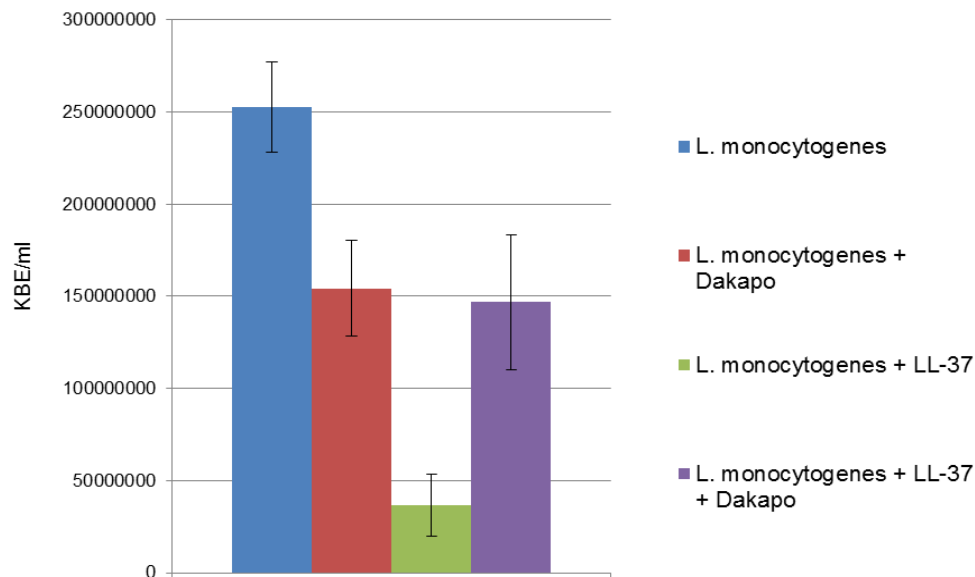


Abb. 52: Effekt des kationischen Peptides LL-37 mit *Dakapo*

Eine ÜNK von *L. monocytogenes* EGD-e (Wt) wurde 1:20 in den Wells der Mikrotiterplatte mit BHI-Nährmedium verdünnt. Nach Zugabe von *Dakapo* (Endkonzentration: 77 µM) oder/und LL-37 (Endkonzentration: 20 µg/ml) wurde nach Inkubation bei 37 °C, 2 Std. die KBE durch Ausplattieren auf je drei BHI-Agarplatten bestimmt. LL-37 hatte einen stärkeren wachstumshemmenden Effekt als *Dakapo*. Bei der Kombinationsbehandlung (*Dakapo* + LL-37) überlagerte der *Dakapo*-Effekt den starken Hemmeffekt des Peptides.

4.6 Mechanismen für die Wachstumsinduktion durch *Dakapo* in EAHEC

4.6.1 Untersuchungen zu oxidativem Stress

Aufgrund des verbesserten Wachstums in Gegenwart von *Dakapo* wurde angenommen, dass das Traubenextrakt in der Lage ist in *E. coli* oxidativen Stress zu vermindern. Dies konnte in den Versuchen mit H₂O₂ und Paraquat gezeigt werden, denn durch *Dakapo* wurde die wachstumshemmende Wirkung dieser Substanzen vermindert (Abb. 53).

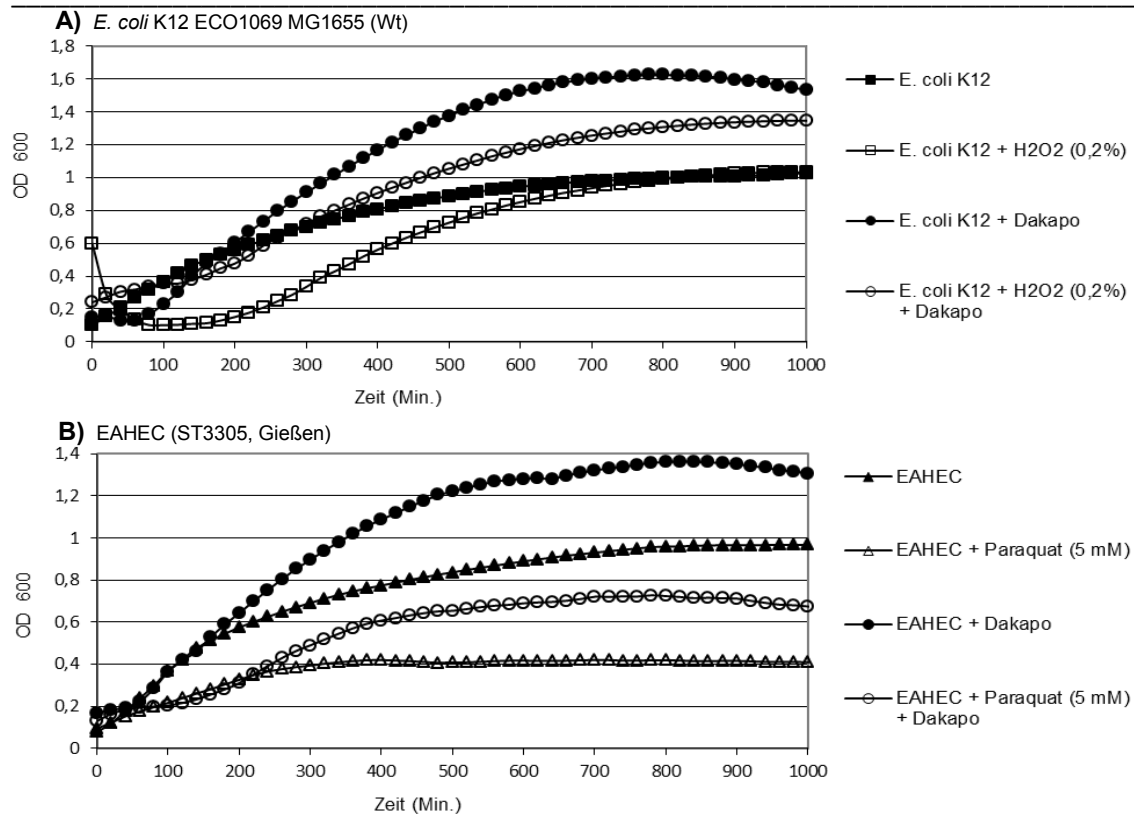
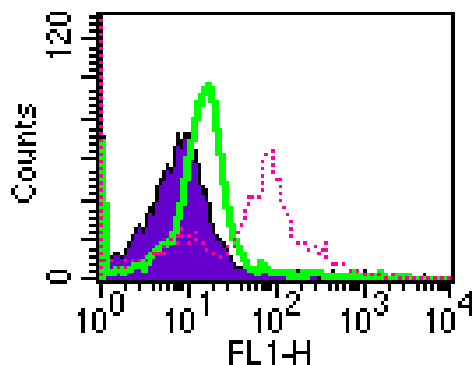


Abb. 53: Abfangen von oxidativem Stress durch Dakapo in *E. coli*

Eine ÜNK von *E. coli* ECO1080 K12 bzw. EAHEC (ST3305, Gießen) wurde 1:20 in den Wells der Mikrotiterplatte mit LB-Nährmedium verdünnt. Nach Zugabe von Dakapo (Endkonzentration: 77 µM) oder/und den Stress-induzierenden Substanzen H₂O₂ (0,2 %) (A) bzw. Paraquat (5 mM) (B) wurde die OD₆₀₀ alle 20 Min. im Mikrotiterplattenlesegerät gemessen. Das Traubenextrakt konnte die hemmende Wirkung beider Substanzen durch Abfangen von oxidativem Stress reduzieren (A,B).

Der antioxidative Effekt von Dakapo konnte ebenso mithilfe von Hydroxyphenylfluorescein (HPF) im FACS-Gerät gezeigt werden. Der durch H₂O₂ verursachte oxidative Stress wurde durch das Traubenextrakt vollständig aufgehoben (Abb. 54).

A) Kontrollexperiment: *E. coli* ECO1080 K12 unbehandelt;
mit Ampicillin (30 µg/ml);
mit Ciprofloxacin (250 ng/ml)



B) *E. coli* ECO1080 K12 unbehandelt;
mit H₂O₂ (0,2 %);
mit Dakapo (77 µM);
mit H₂O₂ (0,2 %) + Dakapo (77 µM)

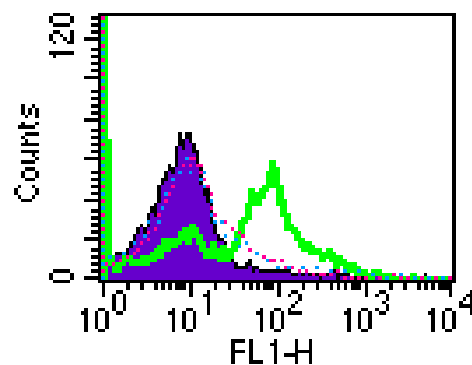


Abb. 54: Untersuchung von oxidativem Stress mittels HPF

Eine ÜNK von *E. coli* ECO1080 K12 wurde 1:20 in 10 ml LB-Nährmedium im Kolben verdünnt, mit Dakapo (Endkonzentration: 77 µM) oder/und H₂O₂ (0,2 %) oder Antibiotika behandelt und über einen Zeitraum von 3 Std. angezüchtet. Nach Anfärben mit dem reactive oxygen species (ROS)-Indikator-Farbstoff Hydroxyphenylfluorescein (HPF) konnte im Durchflusszytometer das Ausmaß der Radikalbildung gemessen werden. Als Kontrolle wurde das Experiment mit Ampicillin (30 µg/ml) und Ciprofloxacin (250 ng/ml) durchgeführt, wobei bei beiden Substanzen die Entstehung von ROS detektiert werden konnte (A). Dakapo fing oxidativen Stress in der Kultur mit H₂O₂ ab (B). Abszisse: FL-1=Fluoreszenz. Ordinate: Counts=Zellzahl.

Im PFGE-Versuch konnten die antioxidativen Effekte besonders effizient gezeigt werden. Die verstärkte Bande durch H_2O_2 -Behandlung (Spur 2) resultierte aus vermehrt aufgetretenen Doppelstrangbrüchen der DNA, die in der mit H_2O_2 und *Dakapo* behandelten Probe vermindert waren. Dies wurde durch eine erheblich schmalere Bande angezeigt (Spur 4) (Abb. 55).

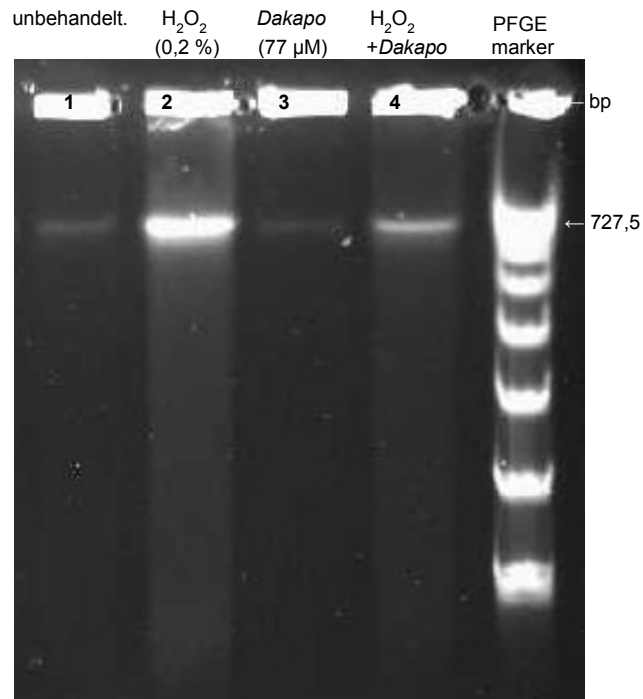


Abb. 55: Antioxidativer Effekt von *Dakapo* in *E. coli* (PFGE)

E. coli wurde 3 Std. im LB-Nährmedium (37 °C, 180 rpm) mit und ohne *Dakapo* (77 µM) oder H_2O_2 (0,2 %) kultiviert und in *Plugs* gegossen. *Dakapo* vermindert die Entstehung von DNA-Strangbrüchen, wie im PFGE-Gel (1 %) durch die dünnere Bande (Spur 4) im Vergleich zur mit H_2O_2 -behandelten Kultur (Spur 2) gezeigt werden konnte.

4.6.2 Effekt isolierter Anthocyane

Analog wie in Kap. 4.5.6 beschrieben wurden die Wirkungen von D-3-G und M-3-G gegen EAHEC getestet. Es zeigte sich bei beiden Substanzen ein wachstumsinduzierender Effekt. Dieser war für M-3-G stark ausgeprägt, während es im Falle von D-3-G nach 10 Stunden zu einer Aufhebung der Wachstumsinduktion kam (Abb. 56).

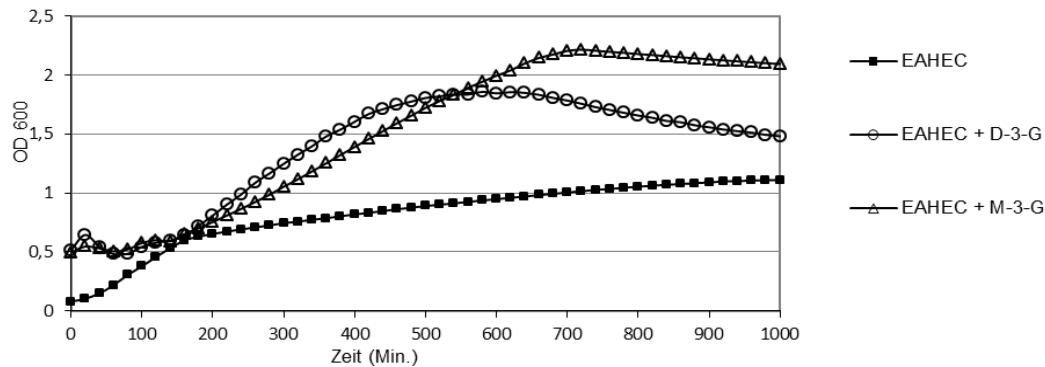


Abb. 56: Effekt von D-3-G und M-3-G auf das Wachstum von EAHEC

Eine ÜNK von EAHEC (ST3305, Gießen) wurde 1:20 in den *Wells* der Mikrotiterplatte mit LB-Nährmedium verdünnt. Nach Zugabe von D-3-G (Fe-komplexierend) bzw. M-3-G (nicht-Fe-komplexierend) (Endkonzentration: 66 μ M) erfolgte die Messung der OD₆₀₀ alle 20 Min. im Mikrotiterplattenlesegerät. M-3-G hatte den gleichen wachstumsinduzierenden Effekt wie *Dakapo*. D-3-G wirkte zunächst wachstumsfördernd, nach ca. 10 Std. ließ der Effekt jedoch nach.

4.6.3 Effekt einer Eisensupplementierung

Der Einsatz von FeCl₃ (3 mM) hemmte das Wachstum von *E. coli* ECO1080 K12. Dieser Hemmeffekt wurde durch *Dakapo* vollständig kompensiert, was auf einen starken Einfluss von *Dakapo* hinwies (Abb. 57).

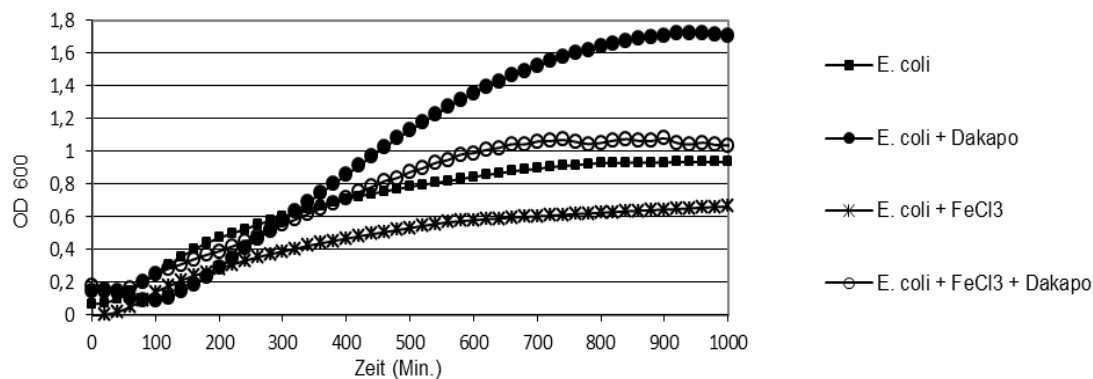


Abb. 57: Effekte einer Eisensupplementierung und *Dakapo* auf das Wachstum von *E. coli*

Eine ÜNK von *E. coli* MG1655 wurde 1:20 in den *Wells* der Mikrotiterplatte mit LB-Nährmedium verdünnt. Nach Zugabe von *Dakapo* (Endkonzentration: 77 μ M) und/oder FeCl₃ (3 mM) erfolgte die Messung der OD₆₀₀ alle 20 Min. im Mikrotiterplattenlesegerät. Der hemmende Effekt von FeCl₃ konnte durch die wachstumsinduzierende Wirkung von *Dakapo* vollständig aufgehoben werden.

4.6.4 Untersuchungen zur Serumresistenz in Kombination mit *Dakapo*

Natives (und ebenso Hitze-inaktiviertes humanes Serum, Anhang A10) hemmte das Wachstum von EAHEC. Dieser Hemmeffekt konnte durch *Dakapo*-Zugabe nach einer kurzen Adaptationszeit von ca. drei Stunden aufgehoben werden (Abb. 58).

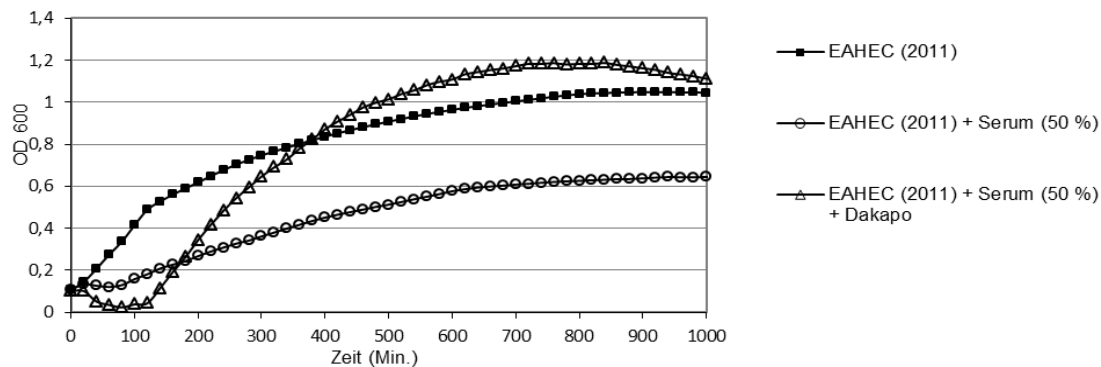


Abb. 58: Erhöhung der Serumresistenz durch *Dakapo* bei EAHEC

Eine ÜNK von EAHEC (ST3305, Gießen) wurde 1:20 in den *Wells* der Mikrotiterplatte mit LB-Nährmedium verdünnt. Nach Zugabe von *Dakapo* (Endkonzentration: 77 µM) und Humanserum (50 %) erfolgte die Messung der OD₆₀₀ alle 20 Min. im Mikrotiterplattenlesegerät. *Dakapo* konnte den wachstumshemmenden Effekt des Serums vollständig aufheben.

Da viele der durch *Dakapo* regulierten, im Eisen-Metabolismus involvierten Gene durch das Gen *fur* reguliert werden (Anhang A13; Abb. 36), erfolgte der Test der *fur*-Mutante *E. coli* ME8332 mit *Dakapo* und Serum. Es zeigte sich, dass die Mutante im Vergleich zu EAHEC (ST3305, Gießen) (Abb. 11) eine erheblich längere Zeitperiode benötigt, um durch *Dakapo* schneller wachsen zu können (Abb. 59A). Der Serum-Hemmeffekt konnte bei der *fur*-Mutante durch das Traubenextrakt *Dakapo* nicht aufgehoben werden (Abb. 59B).

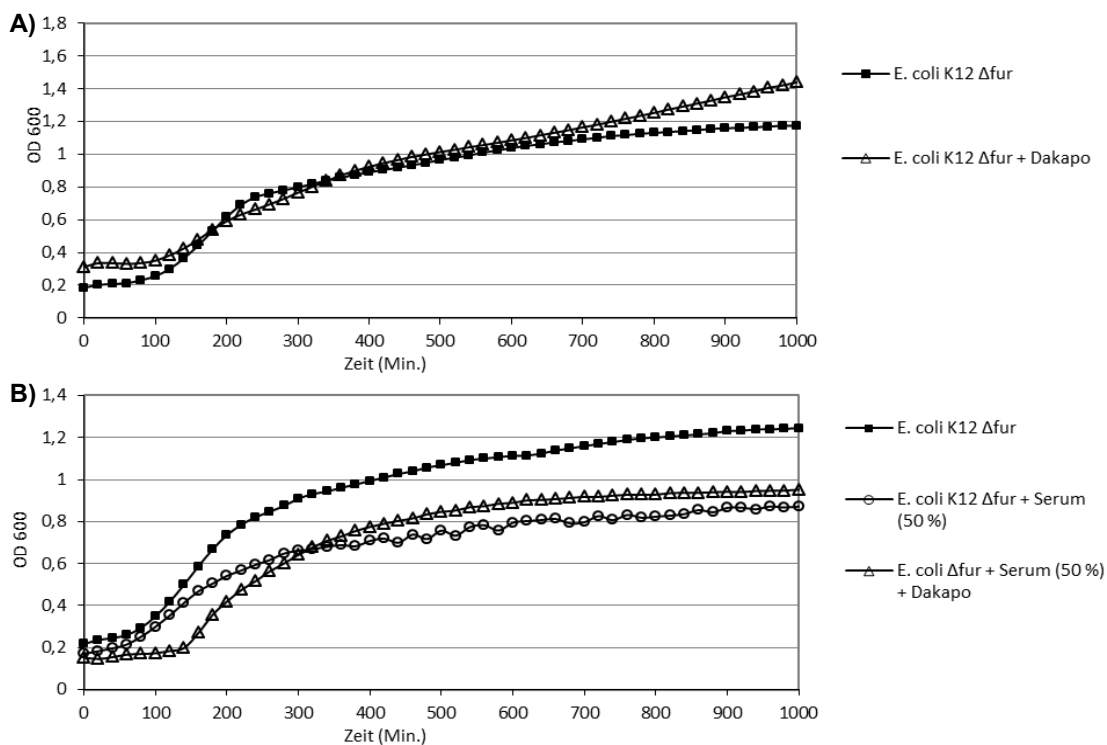


Abb. 59: Einfluss von *Dakapo* und Serum auf die *fur*-Mutante von *E. coli* K12

Eine ÜNK der Δfur -Mutante von *E. coli* ME8332 wurde 1:20 in den *Wells* der Mikrotiterplatte mit LB-Nährmedium verdünnt. Nach Zugabe von *Dakapo* (Endkonzentration: 77 µM) und Humanserum (50 %) erfolgte die Messung der OD₆₀₀ alle 20 Min. im Mikrotiterplattenlesegerät. Im Gegensatz zu EAHEC (ST3305, Gießen) (Abb. 11) hatte *Dakapo* bei der *fur*-Mutante erst nach ca. 12 Std. einen wachstumsfördernden Effekt (A) und das Traubenextrakt konnte den wachstumshemmenden Effekt des Serums in der *fur*-Mutante nicht aufheben (B).

Der apathogene Stamm *E. coli* MG1655 reagierte deutlich sensibler auf Humanserum und der *Dakapo*-Effekt war nur sehr schwach ausgeprägt (Anhang A10). Der Effekt einer Serum-Hitzeinaktivierung wurde insbesondere durch Erhöhung der Serumkonzentration auf 75 % bei EAHEC (bzw. bei 50 % Serum bei *E. coli* MG1655) deutlich, da sich durch die Hitzebehandlung die Adaptationszeit nach Zugabe von Hitze-inaktiviertem Serum in Kombination mit *Dakapo* im Vergleich zum nativen Serum verkürzte (Anhang A10).

4.7 Untersuchung des VBNC-Zustandes von *E. coli* in verschiedenen Gewässern

4.7.1 Bestimmung der Lebendzellzahlen

Über einen Zeitraum von 720 Tagen (103 Wochen) wurde die Persistenz von EAHEC (ST3305, Gießen) und *E. coli* ECO1080 K12 (als Kontrolle) in verschiedenen Gewässern untersucht. Durch Anthocyane kann der *viable-but-not-culturable* (VBNC)-Zustand von *E. coli* möglicherweise aufgehoben oder gemindert werden, da diese das Wachstum der Spezies *E. coli* induzieren. Dabei wurde einerseits der Einfluss der Gewässer analysiert (Fließgewässer (FL), Leitungswasser (LW), Oberflächengewässer (OW)) und andererseits der Effekt bei unterschiedlichen Temperaturen (4 °C; 20 °C) betrachtet. Bei 4 °C persistierten EAHEC und *E. coli* ECO1080 K12 am besten im OW, gefolgt von FL und LW, wobei es ab Tag 320 zu einer drastischen Abnahme der KBE kam (Kap. 3.2.3). Bei 20 °C zeigten sich nur geringe Unterschiede zwischen den Gewässern (Abb. 60). In FL und OW wuchsen bei beiden Stämmen temperaturunabhängig Mikrokolonien auf den Agarplatten, die bei den in LW gehaltenen Bakterien nicht auftraten. Zunächst schienen die Bakterien bei der niedrigeren Temperatur besser zu überleben, langfristig jedoch bei 20 °C (Abb. 61). Wachstumskurven bestätigten diese Ergebnisse (Anhang A11).

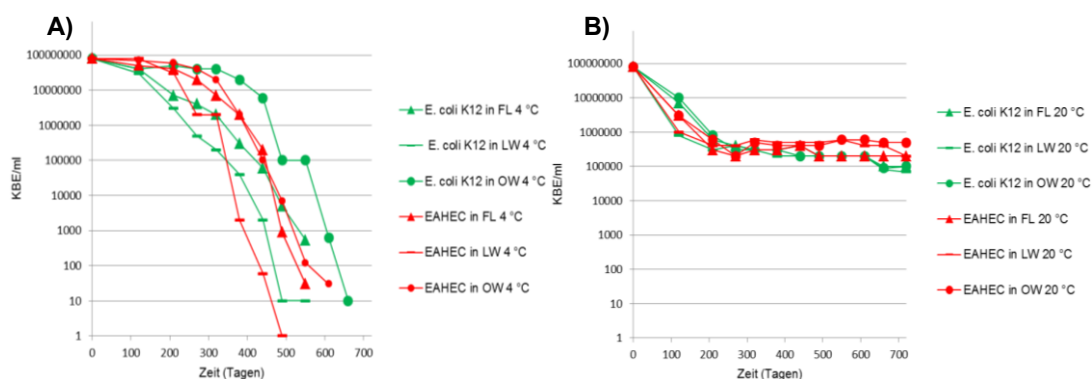


Abb. 60: Überleben von *E. coli* K12 und EAHEC in verschiedenen Gewässern

E. coli ECO1080 K12 und EAHEC (ST3305, Gießen) in FL, LW bzw. OW wurden über einen Zeitraum von 720 Tagen jeweils bei 4 °C (A) bzw. 20 °C (B) beobachtet. In gewissen Zeitabständen (ca. alle 8 Wochen) wurde die KBE durch Ausplattieren auf LB- (*E. coli* K12) bzw. LB-Agarplatten + Cefotaxim (2 µg/ml) (EAHEC) bestimmt. Bei 4 °C überlebten beide Stämme in OW am besten, gefolgt von FL und LW (A). Bei 20 °C zeigten sich keine großen Unterschiede zwischen den Gewässern (B). Das Ende einer Kurve zeigt an, dass keine Kolonien mehr auf den Agarplatten gewachsen sind.

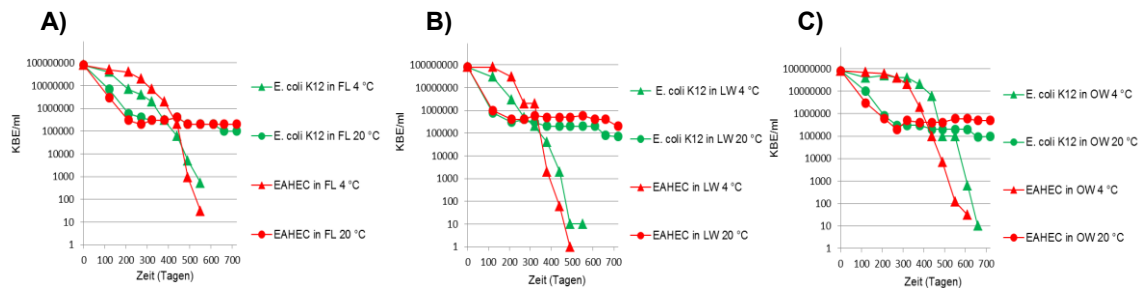


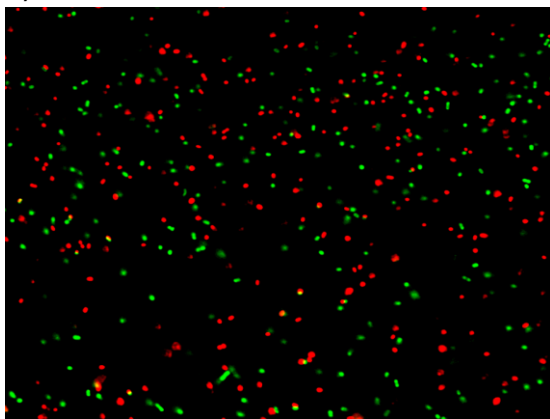
Abb. 61: Überleben von *E. coli* K12 und EAHEC in FL, LW, OW und Vergleich 4 °C mit 20 °C

E. coli ECO1080 K12 und EAHEC (ST3305, Gießen) wurden in FL (A), LW (B) bzw. OW (C) über einen Zeitraum von 720 Tagen jeweils bei 4 °C bzw. 20 °C beobachtet. In gewissen Zeitabständen (ca. alle 8 Wochen) wurde die KBE durch Ausplattieren auf LB- (*E. coli* K12) bzw. LB-Agarplatten + Cefotaxim (2 µg/ml) (EAHEC) bestimmt. Zunächst überlebten die Bakterien bei der kühleren Temperatur besser, langfristig jedoch bei 20 °C. Das Ende einer Kurve zeigt an, dass keine Kolonien mehr auf den Agarplatten gewachsen sind.

4.7.2 Live-Dead-Staining

Das Anfärben mit den Live-Dead-Detektions-Farbstoffen (SYTO 9 dye: färbt alle Bakterien grün; *Propidium iodine*: färbt tote Bakterien rot) zeigte, dass viele Bakterien im FL bereits nach 4 Wochen abgestorben waren im Vergleich zu in LB kultivierten Bakterien (OD_{600} von 1,0) (Abb. 62). Die wenigen, im Gewässer überlebenden Bakterien regenerierten sich demnach, sobald sie unter optimaleren Bedingungen auf LB-Agarplatten kultiviert wurden.

A) EAHEC im FL, 20 °C nach 4 Wochen



B) EAHEC in LB-Medium mit 2 µg/ml CTX

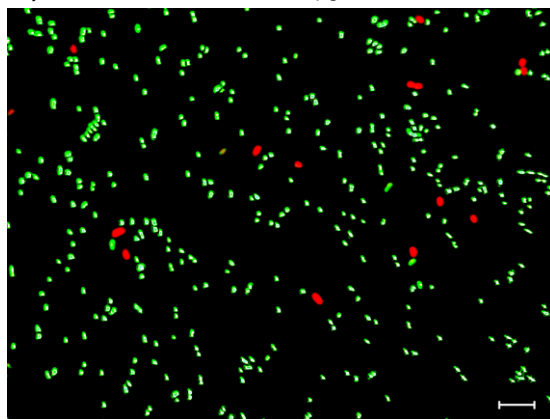


Abb. 62: Live-Dead-Staining von Bakterien

Grün: lebende Bakterien (angefärbt mit SYTO 9 dye). Rot: tote Bakterien (angefärbt mit *Propidium iodine*). Im Kontrollversuch mit einer 1:20 verdünnten ÜNK (Bakterienkultur: OD_{600} von 1,0), lebten deutlich mehr Bakterien (ca. 96 %) (B), als im FL-Ansatz (20 °C) mit nur ca. 47 % überlebenden Bakterien (A). Dies konnte ebenso für die anderen Gewässer (LW, OW) und Temperaturen bestätigt werden [Skalierung: 10 µm].

4.7.3 Effekt von *Dakapo* auf den VBNC-Zustand

Nach 500 Tagen wurden die Kulturen von *E. coli* ECO1080 K12 in den verschiedenen Gewässern in LB-Medium bzw. mit *Dakapo* (77 µM) angereichertem LB-Medium angezüchtet und die optischen Dichten ermittelt. Es zeigte sich, dass *Dakapo* auf die Kulturen in allen Gewässern, temperaturunabhängig, einen wachstumsstimulierenden Effekt hatte und die Bakterien mit *Dakapo*-Supplementation aus dem VBNC-Zustand effizienter regenerierten als nur im LB-Medium. Bei 4 °C wurde der *Dakapo*-Effekt nach

24 Stunden besonders deutlich (Abb. 63C), bei 20 °C bereits nach 16 Stunden (Abb. 63B). Nach 86 Wochen ließ sich EAHEC in OW (4 °C) nach Kultivierung (8 Std., 37°C, 180 rpm) in LB + *Dakapo* (77 µM) wiederbeleben und auf der LB-Agarplatte (+ 2µg/ml CTX) waren 11 KBE auszuzählen, während bei den nur in LB angezüchteten Bakterien keine Kolonien wuchsen. In FL und LW allerdings ließ sich EAHEC zu diesem Zeitpunkt nicht mehr reanimieren.

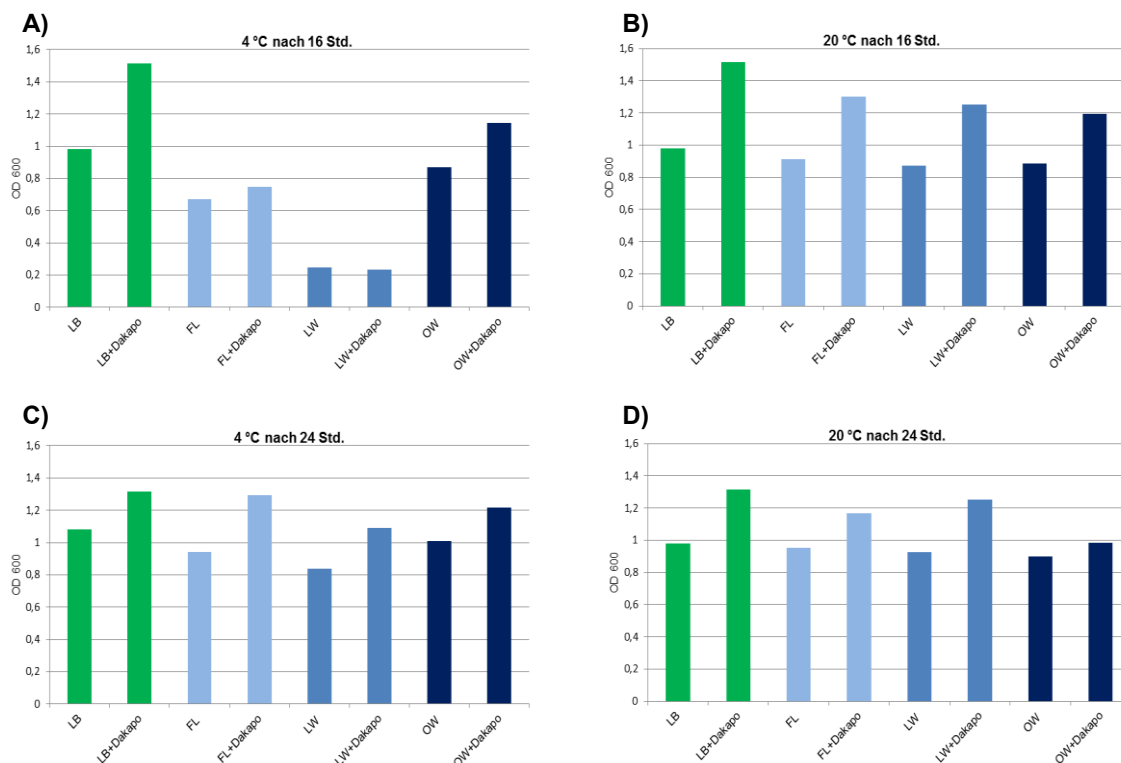


Abb. 63: Effekt von *Dakapo* auf den VBNC-Zustand von *E. coli* in verschiedenen Gewässern

Je 100 µl der "Gewässer-Bakterienkulturen" wurden in *Wells* einer Mikrotiterplatte mit doppelt konzentriertem LB-Nährmedium pipettiert. Nach Zugabe von *Dakapo* (Endkonzentration: 77 µM) erfolgte die Messung der OD₆₀₀ alle 20 Min. im Mikrotiterplattenlesegerät. Der wachstumsinduzierenden Effekt von *Dakapo* in *E. coli* zeigte sich bei den Gewässern in kühlerer Temperatur nach 24 Std. deutlicher (C) als nach 16 Std. (A). Bei den bei 20 °C beobachteten Gewässern war die wachstumsfördernde Wirkung des Traubenextraktes nach 16 Std. stärker (B) als nach 24 Std. (D).

4.7.1 Untersuchungen zur Resistenzstabilität

Während des betrachteten Inkubationszeitraumes kam es in keinem der Gewässer zu einem Resistenzverlust in EAHEC wie exemplarisch nach 400 Tagen für FL (4 °C und 20 °C) in Abb. 64 gezeigt wurde, obwohl die Bakterien in den Gewässern keinem Selektionsdruck ausgesetzt waren.

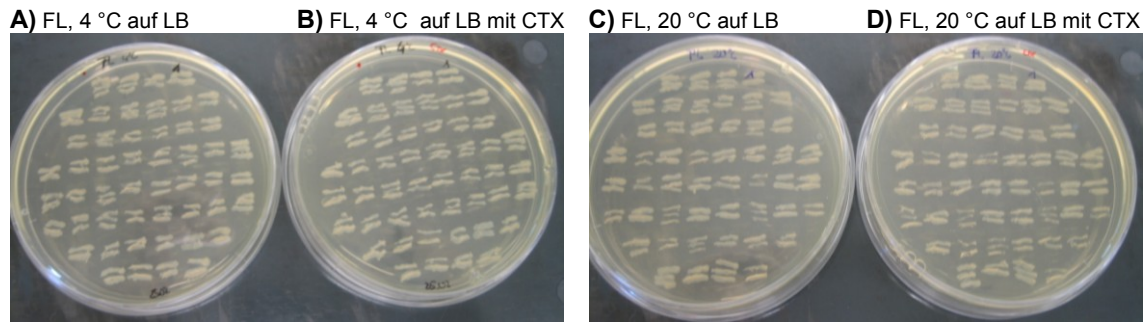


Abb. 64: Untersuchung der Resistenzstabilität von EAHEC in FL

Picken von Kolonien von Agarplatten von EAHEC (ST3305, Gießen) aus FL 4 °C (A,B) bzw. 20 °C (C,D) und Ausstreichen auf LB (A,C) bzw. LB + CTX (2 µg/ml) (B,D). EAHEC wuchs auf beiden Platten temperaturunabhängig gleich gut. Das bedeutet, dass es durch die Inkubation in den Gewässern nicht zu einem Resistenzverlust kam (ebenso getestet für LW und OW).

4.8 Zellkultur mit Insektenzellen aus *G. mellonella*

4.8.1 Hämozyten aus *G. mellonella*

Neben dem beschriebenen Einsatzes von *G. mellonella* als Infektionsmodell eignet sich dieses Insekt für Zellkulturversuche. Als Teil der zellulären Immunantwort sind Hämozyten in *G. mellonella*, wie in Abb. 65 dargestellt, bedeutsam. Der Zellkern und die Bakterien wurden mit DAPI angefärbt (blau), während das Zytoskelett mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Phalloidin Alexa 647 (rot) sichtbar wurde.

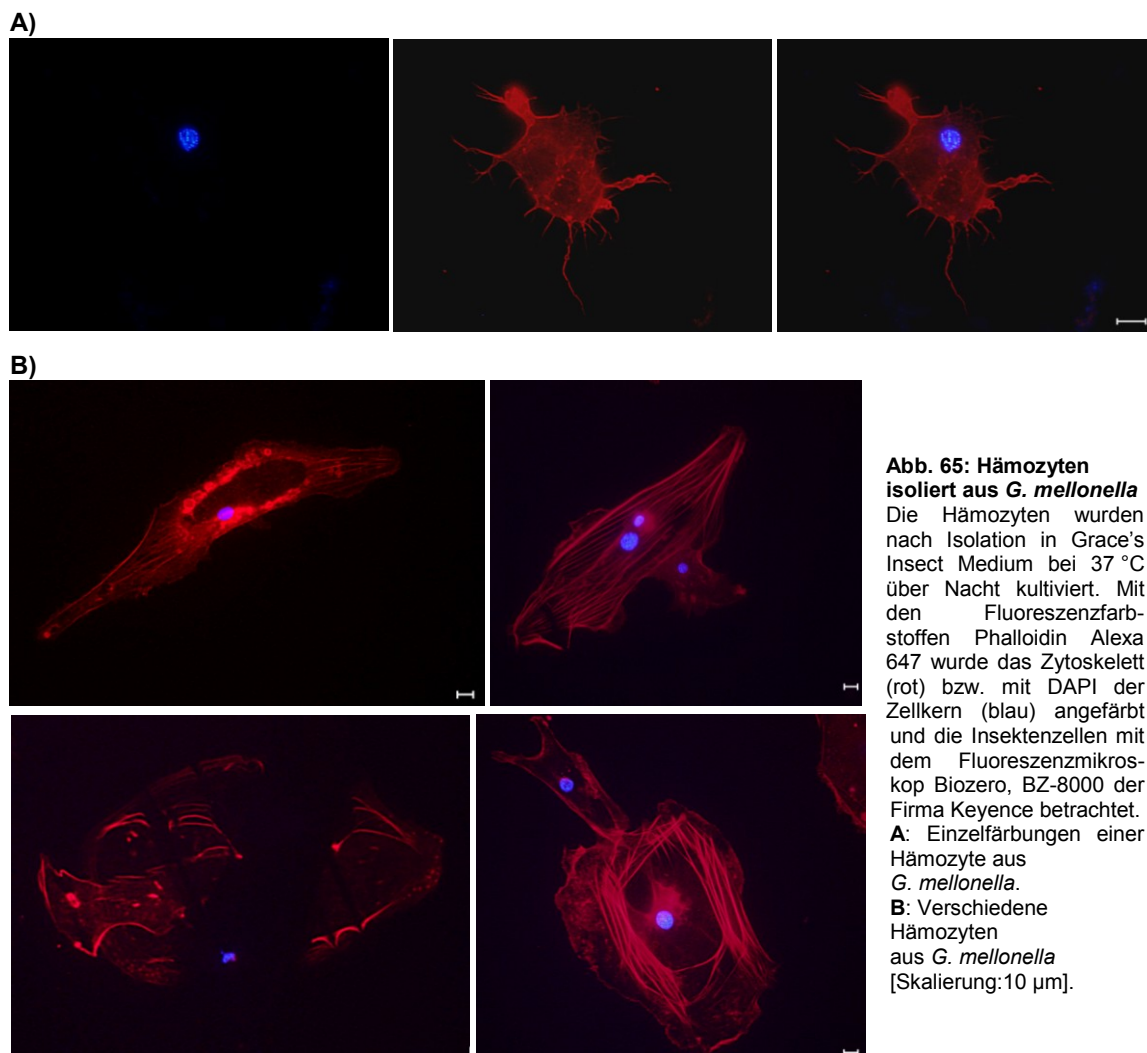


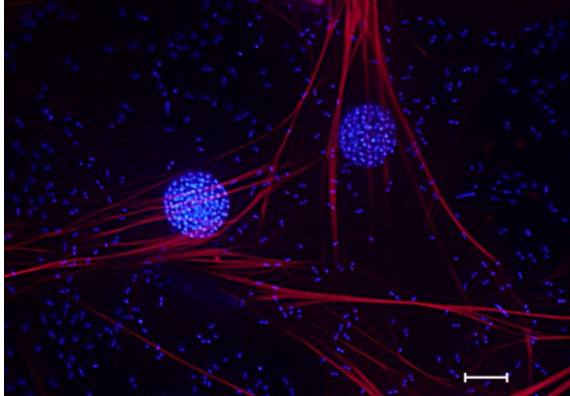
Abb. 65: Hämozyten isoliert aus *G. mellonella*

Die Hämozyten wurden nach Isolation in Grace's Insect Medium bei 37 °C über Nacht kultiviert. Mit den Fluoreszenzfarbstoffen Phalloidin Alexa 647 wurde das Zytoskelett (rot) bzw. mit DAPI der Zellkern (blau) angefärbt und die Insektenzellen mit dem Fluoreszenzmikroskop Biozero, BZ-8000 der Firma Keyence betrachtet. **A:** Einzelfärbungen einer Hämozyte aus *G. mellonella*. **B:** Verschiedene Hämozyten aus *G. mellonella* [Skalierung: 10 µm].

4.8.2 Infektion von Hämocyten mit verschiedenen Bakterien

Die Insektenzellen eignen sich zur Untersuchung bakterieller Infektionen und Wirt-Pathogen-Interaktionen. Nach Infektion der Hämocyten mit dem nicht-pathogenen *E. coli* MG1655 zeigte sich eine homogene Distribution der Bakterienzellen (Abb. 66A), während sich EAHEC, wie für humane intestinale Zellen beschrieben, wie Ziegelsteine aneinander lagerten und sich an die Hämocyten anhefteten („*stacked-brick layer*“) (Abb. 66B; Abb. 67) (Bielaszewska et al., 2011).

A) Infektion mit dem apathogenen *E. coli* MG1655



B) Infektion mit EAHEC (ST3305, Gießen)

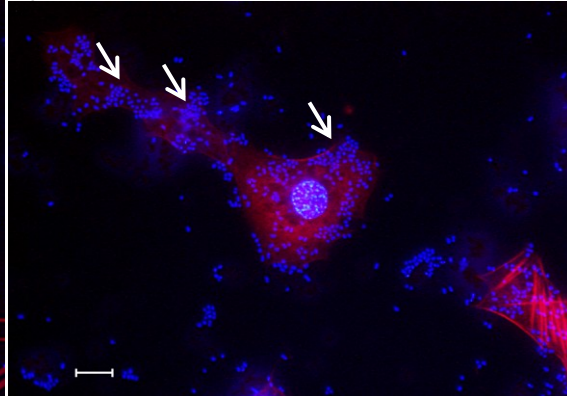


Abb. 66: Infizierte Hämocyten (Fluoreszenzmikroskopie)

Die Hämocyten wurden nach Isolation in GIM bei 30 °C über Nacht kultiviert und anschließend mit logarithmisch gewachsenen Bakterienkulturen (OD₆₀₀ von 1) für 4 Std. bei 37 °C infiziert. Nach Fixierung mit Formaldehyd (3,7 %) und Permeabilisierung mit Triton (0,2 %) erfolgte das Anfärben mit den Fluoreszenzfarbstoffen Phalloidin Alexa 647 für das Zytoskelett (rot) bzw. mit DAPI für den Zellkern und die Bakterien (blau). Die Pfeilspitzen weisen exemplarisch auf die durch EAHEC gebildete so genannte „*stacked-brick layer*“ (B), während sich bei dem apathogenen *E. coli* eine gleichmäßige Verteilung zeigte (A). Mikroskopiert wurde mit dem Fluoreszenzmikroskop der Firma Keyence [Skalierung: 10 µm].

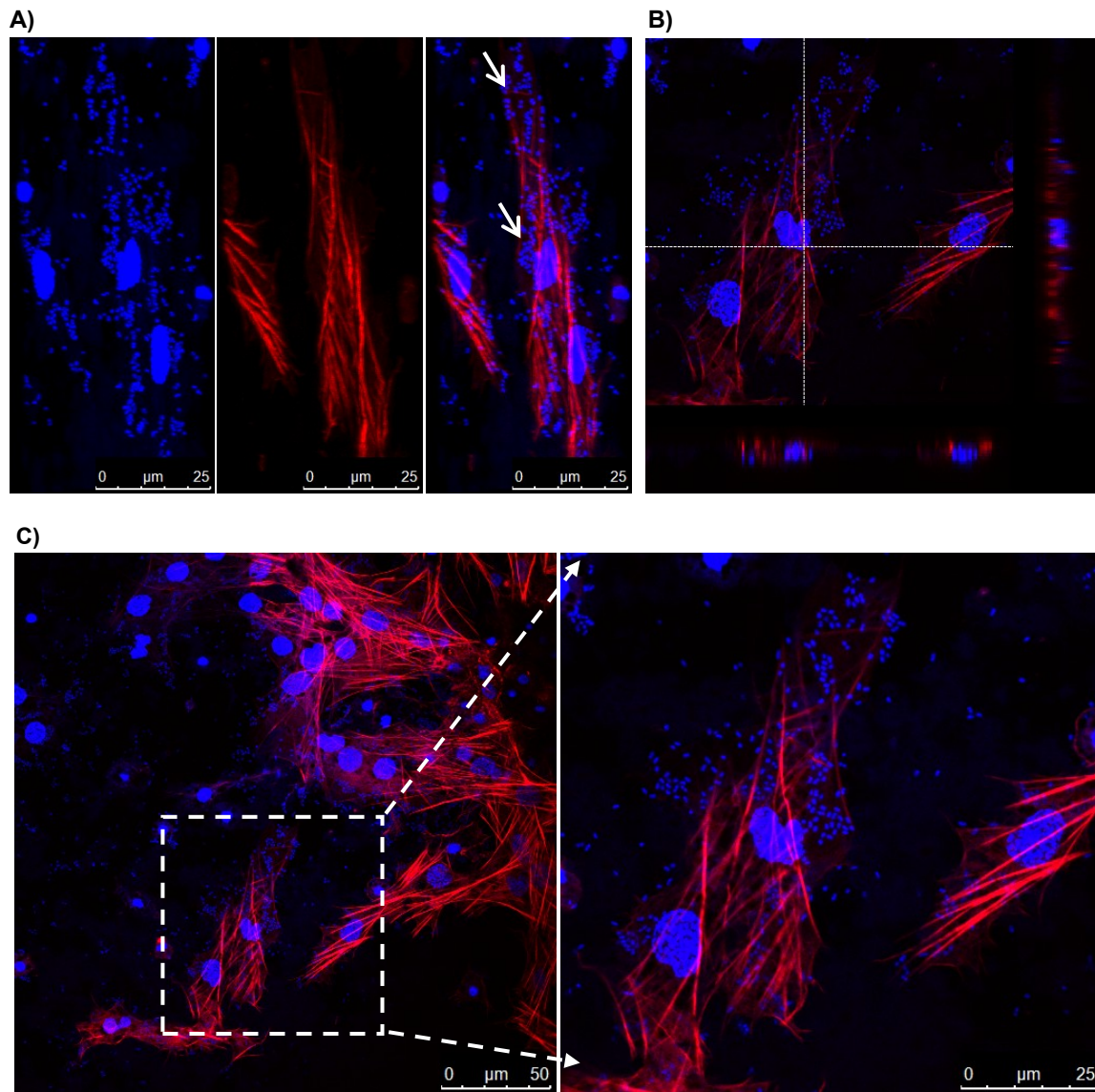


Abb. 67: Infizierte Hämozyten mit EAHEC (Konfokalmikroskopie)

Die Hämozyten wurden nach Isolierung in GIM bei 30 °C über Nacht kultiviert und anschließend mit einer logarithmisch gewachsenen Bakterienkultur (OD_{600} von 1) von EAHEC (ST3305, Gießen) für 4 Std. bei 37 °C infiziert. Nach Fixierung mit Formaldehyd (3,7 %) und Permeabilisierung mit Triton (0,2 %) erfolgte das Anfärben mit den Fluoreszenzfarbstoffen Phalloidin Alexa 647 für das 4-Nitrophenyl β -D-glucopyranoside Zytoskelett (rot) bzw. mit DAPI für den Zellkern und die Bakterien (blau). Die Pfeilspitzen zeigen exemplarisch auf die durch EAHEC gebildete so genannte „*stacked-bricked layer*“. Mikroskopiert wurde mit dem Konfokalmikroskop Leica TCS SP5. **A:** Einzelfärbungen einer infizierten Hämozyte. **B:** Infizierte Hämozyte mit Querschnitten. **C:** Zoom.

5 Diskussion

5.1 Problemstellung

Zahlreiche pathogene Bakterien werden über Lebensmittel übertragen. Dazu zählen die in der vorliegenden Dissertation untersuchten Spezies *Listeria monocytogenes* und pathogene Stämme von *Escherichia coli* wie der enteroaggregative-hämorrhagische *E. coli* (EAHEC), der 2011 in Deutschland und europaweit für zahlreiche Infektionen und Todesfälle verantwortlich war (Anhang A1). Die rückwirkenden Analysen deuten darauf hin, dass EAHEC über aus Ägypten importierte Bockshornkleesprossen übertragen wurde, allerdings wurde der Erreger bis heute nicht eindeutig auf den Sprossen oder anderen Lebensmitteln nachgewiesen. Die Interaktion von Nahrungsmittelbestandteilen und deren Einfluss auf das Wachstum von (krankheitserregenden) Bakterien sind interessant für die Aufklärung von derartigen Epidemien und bei der Prävention von Infektionen. Anthocyane aus verschiedenen Beerenextrakten (z.B. Weintrauben, Heidelbeere, Holunder) sind für den Menschen von Relevanz, da sie natürlicherweise über die Nahrung aufgenommen werden. Sie hemmten in den vorliegenden Experimenten das Wachstum von einigen wenigen untersuchten Bakterien (z.B. *L. monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*), induzierten allerdings das Wachstum von zahlreichen Bakterien, insbesondere der *Enterobacteriaceae*-Familie, unabhängig von deren pathogenem Potential oder Resistenzmustern. Der EAHEC-Ausbruch 2011 war besonders problematisch, da es sich um einen multiresistenten Krankheitserreger handelte und die Therapieoptionen aus diesem Grund stark eingeschränkt waren. Im Rahmen des LOEWE-Forschungskoooperationsprojektes „Insektenbiotechnologie“ sollten verschiedene antimikrobielle Peptide (AMP) aus Insekten getestet werden, um Substanzen zu identifizieren, die gegen solche resistenten und multiresistenten, pathogenen Bakterien eingesetzt werden können.

In einer Stufenanalyse wurden erfolgsversprechende Substanzen zunächst *in vitro* im Hochdurchsatzverfahren identifiziert, dann *in vivo* im Infektionsmodell in Larven von *Galleria mellonella* getestet und anschließend konnten mittels Transkriptomanalysen die Wirkmechanismen untersucht werden, die für die beobachteten Effekte verantwortlich waren. Idealerweise folgen Tierexperimente und Humanstudien, bis die Substanzen letztlich in der Lebensmittel- und Pharma-Industrie Verwendung finden können.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden die Transkriptomexperimente aus folgenden Gründen mit dem Anthocyan-reichen Traubenextrakt *Dakapo* durchgeführt:

- Für Transkriptomanalysen und weitere Versuche sind größere Mengen an Testsubstanz Voraussetzung zur Durchführung der Forschungsaktivitäten. *Dakapo* stand für diese Zwecke in ausreichender Menge zur Verfügung, wirksame Insekten-AMP zu diesem Zeitpunkt jedoch nicht.
- Die Insekten-AMP zeigten nur vereinzelt in für die Klinik interessanten (niedrigen) Konzentrationen (<100 µg/ml) Effekte. Anthocyane hingegen sind als antioxidativ wirksame Substanzen bekannt. Divergierende Effekte (Wachstumsinhibition, -induktion, keine Wirkung) gegenüber verschiedenen Bakterienspezies werfen Fragen im Hinblick auf das antioxidative Potential der Anthocyane auf. Welche Mechanismen liegen diesen Effekten zugrunde? Was führt dazu, dass Anthocyan-haltige Beerenextrakte das Wachstum von einigen Bakterien förderten, von anderen Bakterien jedoch hemmten, unabhängig vom pathogenen Potential der Mikroorganismen?
- Das Beerenextrakt der Traubensorte *Dakapo* wurde für die Transkriptomanalyse mit *L. monocytogenes* und EAHEC gewählt, da die Effekte gegenüber verschiedenen Bakterien bei dieser Anthocyan-reichen Substanz am stärksten ausgeprägt waren.

Bei der Wahl der für die Transkriptomanalyse selektierten Bakterienspezies wurden folgende Aspekte berücksichtigt:

- *L. monocytogenes* und EAHEC können beide durch Lebensmittel übertragen werden.
- EAHEC wird als Vertreter der durch *Dakapo* im Wachstum induzierten, pathogenen Bakterien gewählt. Aufgrund des Ausbruchs 2011 in Deutschland mit diesem hochpathogenen Krankheitserreger (S3-Organismus) ist es interessant, die Mechanismen zu identifizieren, die der Wachstumsstimulation durch die Anthocyane zugrunde liegen und *in vivo* die Effekte einer bestimmten Infektionsdosis mit anderen Stämmen von *E. coli* zu vergleichen. Nach der Transkriptomanalyse wurden bei EAHEC aufgrund des hohen Pathogenitätspotentials weiterführende Experimente zum Teil mit einem apathogenen Stamm von *E. coli* durchgeführt, bei dem *Dakapo* ebenso einen wachstumsinduzierenden Effekt zeigte.
- *L. monocytogenes* wurde als Vertreter der durch *Dakapo* im Wachstum inhibierten Bakterien ausgesucht. Mit dieser Bakterienspezies sind bereits zahlreiche Studien am Institut durchgeführt worden und entsprechende isogene Mutanten verfügbar. Diese konnten für sich an die Transkriptomanalyse anschließende Versuche verwendet werden.

- Der wachstumshemmende Effekt von *Dakapo* ist vor dem Hintergrund der Suche nach neuen Antiinfektiva von noch größerer Bedeutung, als die Wachstumsinduktion in *E. coli*, weshalb sich die Forschungsarbeiten nach der Transkriptomanalyse auf das opportunistische Pathogen *L. monocytogenes* fokussierten.

Es ist wichtig zu beachten, dass es sich bei dem Traubenextrakt *Dakapo* um ein Naturprodukt handelt. Der Gehalt an Inhaltsstoffen, wie einzelnen Anthocyanen, unterliegt starken Schwankungen. Diese sind durch den Jahrgang bedingt, da Wettereinflüsse, Erntezeitpunkt, Boden, Düngung, Pilzbefall, Insekten, Verarbeitung, Lagerbedingungen und Alterung von Jahr zu Jahr stark variieren und eine Standardisierung der Inhaltsstoffe nicht oder nur sehr schwer möglich ist. Daher ist es beim Vergleich der vorliegenden Ergebnisse mit anderen Publikationen, in denen Anthocyan-reiche Substanzen an Bakterien getestet wurden, sehr wichtig die Substanzen und deren Anthocyan-Muster genau zu betrachten. Es bleibt des Weiteren anzumerken, dass die maximal einsetzbare Endkonzentration an Beerenextrakten limitiert war. Einerseits *in vitro* bei den Messungen der optischen Dichte aufgrund der starken, blauen Eigenfarben der Substanzen und andererseits *in vivo*, denn die in die Larve injizierte Endkonzentration von 30 μM *Dakapo* (bzw. 153 $\mu\text{g/Larve}$) wurde von den Larven noch metabolisiert. Nach der Injektion färbten sich diese zwar blau, nahmen aber schon nach einigen Stunden ihre ursprüngliche Farbe wieder an (Abb. 10). Die eingesetzte Konzentration der Anthocyan-haltigen Stocklösung konnte jedoch nicht beliebig erhöht werden, da die Larven bei zu hohen Endkonzentrationen abstarben.

Zunächst sind die Ergebnisse mit den Insekten-AMP und das Infektionsmodell *G. mellonella* Bestandteil der Diskussion, anschließend die komplexen und interagierenden Prozesse, die die Transkriptomanalysen mit *Dakapo* offenlegten.

5.2 Effekte der AMP

Die getesteten AMP verschiedener AMP-Klassen sind in Datenbanken wie der *The Antimicrobial Peptide Database* (APD) oder UniProt (2013) zu finden, mit Ausnahme der *Defensine* von *Tribolium castaneum*, wobei drei verschiedene *Defensine* in diesem Insekt charakterisiert wurden (Altincicek et al., 2008). Für Insekten-*Defensine* werden in der Literatur insbesondere gegenüber Gram-positiven Bakterien der Genera *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Corynebacterium*, *Clostridium* und *Streptomyces* antimikrobielle Wirkungen beschrieben, weniger gegenüber Gram-negativen Erregern (Hofmann & Hetru, 1992). Allen weiteren getesteten AMP wird in

den Datenbanken eine antibakterielle und/oder antimykotische Aktivität zugewiesen. Diese antibakterielle Aktivität konnte in der vorliegenden Studie allerdings nur für wenige AMP bestätigt werden. In der Datenbank APD werden nur AMP mit einer minimalen Hemmkonzentration (MHK) von <100 µM oder 100 µg/ml registriert (Wang & Wang, 2009). Nach dieser strengen Konvention waren lediglich das Cys-reiche *Defensin Tca1* von *T. castaneum* gegenüber der Δ sodA-Mutante (Δ lmo1439) von *L. monocytogenes* und gegen Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) sowie das α -helikale AMP *Stomoxyn* von *Stomoxys calcitrans* gegen *Klebsiella pneumoniae* (ESBL) wirksam, so dass diese AMP für weitere Forschungsaktivitäten von Interesse sind. In höheren Konzentrationen waren jedoch einige der AMP insbesondere gegen Gram-negative Bakterienspezies effizient, während sie gegenüber Gram-positiven keine Wirkung hatten. Gegen den pathogenen, multiresistenten EAHEC der Epidemie 2011 in Deutschland wirkten von den 29 getesteten AMP fünf AMP (zwei Cecropine, zwei Apidaecine und Stomoxyn) in einer Konzentration von 1 mg/ml bakterizid (Tab. 11). Obgleich diese Wirkkonzentration relativ hoch war, zeigte sich dennoch die Effizienz dieser Naturstoffe als potenziell neuartige Antiinfektiva gegenüber dem multiresistenten EAHEC.

Wie aus der Literatur bekannt, interagieren die kationischen AMP mit der negativ geladenen Oberfläche der Bakterien durch elektrostatische Bindung der AMP, wobei die Wirkmechanismen sehr unterschiedlich sind (Bulet et al., 2004). Durch die Anlagerung und Integration der AMP an die bakterielle Oberfläche kommt es zu einer Verdünnung der bakteriellen Zellmembran. Ebenso wird eine AMP-konzentrationsabhängige Porenbildung als Aufnahmemechanismus beschrieben. Dies erklärt den linear konzentrationsabhängigen Effekt bei *Cecropinen A*, *Sarcotoxin 1A* und *Stomoxyn* (Abb. 16A,B; Abb. 17A,B; Anhang A4 und A5). Bei *Ceratotoxin* und den *Metalnikowinen* wurde in *E. coli* ab einer gewissen Konzentration ein abrupter Wirkungseffekt festgestellt, der darauf zurückzuführen sein könnte, dass sich ab einer bestimmten AMP-Konzentration Poren in der Bakterienmembran bilden, so dass die AMP in die Zelle eindringen und das Bakterienwachstum inhibieren können (Abb. 16C,D; Anhang A4). Dieser mit einer Art „Quantensprungergebnis“ vergleichbare Effekt war auch für *Ceratotoxin* und *Sarcotoxin 1A* in *K. pneumoniae* (Gram-negativ) erkennbar (Abb. 17C,D). Es wirkten weniger AMP gegen dieses multiresistente Pathogen als gegen *E. coli*-Spezies, was an der Kapsel liegen könnte, die *K. pneumoniae* zusätzlich schützt. Für die AMP *Apidaecin 1A*, *Apidaecin*, *Drososin* und *Pyrhocoricin* ist aus der Literatur ein Wirkmechanismus über das bakterielle Hitzeschockprotein DnaK bekannt, wobei die AMP-Anlagerung die Chaperon-unterstützte Proteinfaltung und die ATPase-abhängige Aktivität von DnaK verhindert

(Bulet et al., 1996; Gobbo et al., 2002; Bulet & Stöcklin, 2005; Kragol et al., 2001; Kragol et al., 2002; Morell et al., 2008; Zhu et al., 1996). DnaK ist in die chromosomale DNA-Replikation involviert (UniProt, 2013) und aus diesem Grund kann eine Hemmung von DnaK durch die genannten AMP zu einer AMP-konzentrationsabhängigen Wachstumsinhibition führen.

Neben diesen bereits bekannten Wirkmechanismen der AMP gab das Experiment mit der $\Delta oppA$ -Mutante von *L. monocytogenes* Hinweise, dass wirksame AMP wie *Defensin Tca1* in *L. monocytogenes* über ABC-Transporter aufgenommen werden. Die Experimente mit dieser Mutante wurden in Zusammenarbeit mit Gopala K. Mannala (Doktorand am Institut) durchgeführt, der die Analysen mit dieser Mutante fortführt. Das deletierte Gen *Imo2196 (oppA)* kodiert für ein 62-kDa Oligopeptidtransportsystem-Substrat-bindendes Protein. Dieses Gen kodiert in Abhängigkeit von der Bakterienspezies für ein Peptidbindeprotein, das Peptide mit einer Größe von 2-18 AS transportiert (Monnet, 2003). Die Ausschaltung des Gens resultierte in einer deutlich schlechteren Wirksamkeit von *Defensin Tca1* (44 AS) (Abb. 15) im Vergleich zum Wildtyp (Wt). Dies gab Hinweise, dass das AMP über das *opp*-Operon, das sich aus fünf Genen (*oppA*, *oppB*, *oppC*, *oppD* und *oppF*) zusammensetzt, transportiert wird. Allerdings muss das AMP zuvor gespalten werden, um von diesem Transporter aufgenommen werden zu können. Das beschriebene Oligopeptidtransportsystem gehört zur Familie der ABC-Transporter, die mithilfe der ATP-Spaltung Energie für den Peptidtransport gewinnt. Dabei wird zwischen dem extrazellulären AMP-Bindungsprotein (*oppA*), zwei transmembranen Poren-bildenden Proteinen (*oppB*, *oppC*) und den zwei für die ATP-Spaltung verantwortlichen Proteinen (*oppD*, *oppF*) unterschieden. Das erste Gen dieses Operons, *oppA*, kodiert für ein Protein, das vor allem in der Phase exponentiellen Wachstums exprimiert wird. Das Lipoprotein OppA transportiert Oligopeptide und ist für das Wachstum bei niedrigen Temperaturen wichtig (Borezee et al., 2000). Möglicherweise würde die Deletion weiterer Oligopeptid-transportierender Gene wie *Imo2192*, *Imo2193*, *Imo2194* und *Imo2195* die Effizienz von *Defensin Tca1* weiter reduzieren.

Aufschlussreich für Wirkmechanismen der AMP war ebenso der Effekt gegenüber der $\Delta sodA$ -Mutante von *L. monocytogenes*, bei der einige AMP deutlich wirksamer als im Wt waren (Tab. 11). Bei dieser Mutante kann aus Superoxidanion ($O_2^{\bullet-}$) kein Wasserstoffperoxid (H_2O_2) gebildet werden, wobei die $\Delta sodA$ -Mutante allgemein schlechter wuchs als der Wt (Abb. 44). AMP, die im Wt keine Effekte zeigten, hemmten das Wachstum der $\Delta sodA$ -Mutante (Tab. 11). Dies deutete darauf hin, dass oxidativer Stress als Wirkmechanismus eine Rolle spielt. Sobald nicht alle für den Abbau von

oxidativem Stress notwendigen Enzyme aktiv sind, ist die Bakterienzelle empfindlicher gegenüber den AMP.

Die getesteten AMP wurden synthetisch hergestellt, da eine Isolierung aus natürlichen Organismen zu aufwendig, teuer und nicht standardisiert möglich war. Insekten-*Defensine* unterscheiden sich strukturell von Vertebraten-*Defensinen*, die von einer antiparallelen β -Faltblattstruktur durch Disulfidbrücken stabilisiert werden, aber selten α -Helix-Strukturen enthalten (Hoffmann & Hetru, 1992; Bulet et al., 2004). Im Falle des Defensins *Tca1* ist es von entscheidender Bedeutung, dass die enthaltenen Disulfidbrücken innerhalb der Cys-Reste korrekt verknüpft sind, da nur das AMP mit richtig verbundenen Disulfidbrücken antimikrobiell aktiv war (Abb. 68; Tab. 11). Bei der AMP-Synthese stellt diese korrekte Verknüpfung der Disulfidbrücken eine Schwierigkeit dar, weshalb die Herstellung des AMPs sehr kostenintensiv ist.

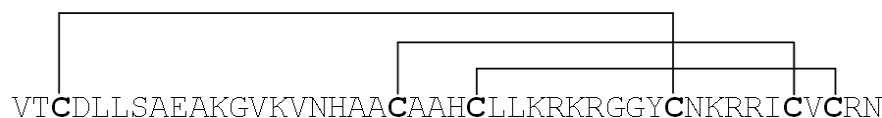


Abb. 68: Korrekte Disulfidbrückenverknüpfung in Defensin *Tca1* (*T. castaneum*)

Weiterhin bleibt anzumerken, dass es sich bei zehn der 29 getesteten AMP um nicht aufgereinigte Rohpeptide handelte (Tab. 5). Bei den AMP-Experimenten hat sich herausgestellt, dass die AMP-Aktivitäten entscheidend davon abhingen, wie frisch gelöst das AMP ist. Die Effizienz der AMP scheint im gelösten Zustand durch Auftau- und Einfrierprozesse beeinträchtigt zu werden, was für weitere Analysen mit den AMP und bei einer eventuellen klinischen Applikation bedacht werden muss.

In vivo zeigten *in vitro* wirksame AMP einen Schutzeffekt in *G. mellonella*. Dieses Insektenmodell wird zur Pathogenitätstestung verschiedenster Bakterien und für die Testung von neuen antimikrobiellen Agentien verwendet. Infektionsversuche mit *G. mellonella* sind geeignet für Gram-positive und Gram-negative Bakterien, denn das als Endotoxin wirkende Lipopolysaccharid (LPS) spielt nicht die entscheidende Rolle für die Pathogenität der Gram-negativen Bakterien, da nach Injektion des apathogenen *E. coli* K12 alle Larven überlebten (Abb. 20C). Einzigartig bei *G. mellonella* ist die Beobachtung der Infektion bei einer Temperatur von 37 °C, die von diesem Organismus toleriert wird, im Gegensatz zu Infektionsexperimenten mit *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans*, die normalerweise bei 30 °C durchgeführt werden (Desbois & Coote, 2012). Dabei ist anzumerken, dass die Bakterien und AMP in den vorliegenden Experimenten kurz vor der Injektion zusammengefügt und dann in einer Einmalinjektion in die Larven gespritzt wurden (Kap. 3.2.7). Durch die einmalige Injektion entsteht den Larven weniger Stress. Denkbar wäre es ebenso, die Bakterien zuerst zu injizieren und die wirksamen AMP erst einige Zeit später, was eine Therapie

mit den AMP bedeuten würde, wobei sich dieses Vorgehen einer „Doppelinjektion“ allerdings experimentell als ungeeignet erwies. Weiterhin wäre es möglich, zunächst das AMP in die Larven zu spritzen und diese dann mit Bakterien zu infizieren, was der Prävention einer Infektion entsprechen würde. Allerdings waren viele der AMP nur für einen gewissen Zeitraum wirksam, so dass diese in bestimmten Zeitintervallen in die Larven von *G. mellonella* injiziert werden müssten. Im Rahmen der *in vivo*-Vorselektion dieser Arbeit wurde allerdings von Mehrfachinjektionen abgesehen, um den Applikationsprozess zu standardisieren und die Larven nicht unnötig zu stressen. Die Verwundung durch die Injektion induziert bereits eine Immunreaktion in der Larve. Dies wurde in *T. castaneum* untersucht, bei dem eine Injektion mit steriler Salzlösung zur Induktion der in die Immunantwort involvierten Proteine *Defensin-2*, *Thaumatin-1* und *ApoD* führte. Die Immunantwort (nach bakterieller Infektion) und Stressantwort (durch Verwundung mit der Injektionsnadel) scheinen eng verknüpft zu sein (Altincicek et al., 2008). Es zeigte sich in den vorliegenden Analysen bei allen *in vivo* getesteten AMP, dass diese im Insektenmodell über einen Beobachtungszeitraum von fünf Tagen protektiv gegenüber verschiedenen Bakterien wirkten (Abb. 23; Abb. 25; Abb. 26). Die Kombination aus AMP und den eigenen Abwehrsystemen der Larven, wie sie in Kap. 1.5 beschrieben werden, scheinen die Pathogenen effizient abzuwehren.

Neben der Injektion sind weitere Applikationswege denkbar wie das Aussetzen der Bakterien auf der Cuticula der Larven. Entscheidender Nachteil dieser Methode ist die unzureichende quantitative Bestimmung des infizierten Inokulums (Scully & Bidochka, 2005). Für die orale *ad libitum* Applikation werden Pathogene in die Futtermischung gegeben, die die Larven unter Laborbedingungen in den Petrischalen umgibt. Vorteilhaft bei dieser Ingestionsmethode ist die Nachahmung einer natürlichen Infektion über kontaminierte Nahrung, aber die von den Larven aufgenommene Bakteriendosis kann nicht definiert, sondern lediglich das Inokulum in jeder Petrischale angegeben werden. Das könnte erklären, warum bei den Larven allgemein eine geringere Mortalität nach oraler Infektion mit verschiedenen Bakterien zu verzeichnen ist, als nach direkter Injektion (Fedhila et al., 2010). Die in dieser Forschungsarbeit angewandte Injektionsapplikation ist die am besten geeignete Methode, da sie es ermöglicht, sowohl die Bakteriendosis als auch die injizierte AMP-Konzentration genau zu quantifizieren.

5.3 Effekte der Anthocyane

Effekte von *Dakapo* auf EAHEC

Die Transkriptomanalyse gab Hinweise, dass in EAHEC durch *Dakapo*-Zugabe eine optimale Regulierung der Eisenhomöostase stattfindet. Anthocyane wirken als

Antioxidantien, einerseits durch Chelatbildung mit Metallen bei Anthocyanen mit zwei ortho-verwandten Hydroxylgruppen im B-Ring (Abb. 6A), was die Hydroxylradikal (OH•)-Produktion verhindert, und andererseits durch das direkte Scavenging von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*) (ROS).

Bei der Auswertung der großen Mengen an Transkriptomdaten ist es von großer Relevanz, welche Daten bei der Interpretation berücksichtigt werden, d.h. bis zu welchem *fold change* Gene eingeschlossen werden und welche Mindestanzahl an *reads* vorausgesetzt wird. Für die Analyse der Transkriptomdaten der vorliegenden Arbeit wurden zunächst nur Gene betrachtet, die den Kriterien von mindestens 10 *reads* entsprachen und eine veränderte Expressionsrate von $\leq -1,9$ bzw. $\geq +1,9$ zeigten. Bereits bei diesem *fold change* zeigte sich eine enorme Regulierung mit veränderten Expressionsraten bei 18 % der analysierten Gene. Insbesondere war eine Hochregulierung von Genen zu verzeichnen, die in der Eisenhomöostase involviert sind (37 % der induzierten Gene) (Abb. 36A). Wurde der *fold change* bei $\leq -3,0$ bzw. $\geq +3,0$ gesetzt, zeigten sich die Veränderungen im Eisenmetabolismus noch deutlicher. Fast die Hälfte (45 %) der durch das Traubenextrakt regulierten Gene spielen im Eisenmetabolismus eine Rolle oder kodieren für Eisen-haltige bzw. -Eisen-abhängige Proteine. Mit dieser mindestens dreifach erhöhten Expressionsrate waren unter den durch Dakapo induzierten Genen 83 % am Eisenstoffwechsel beteiligt (Abb. 36B), wobei die meisten von diesen durch Fur reguliert werden (Anhang A13.1).

Die ausgeprägten Veränderungen in der Eisenhomöostase durch *Dakapo* deuteten auf einen sehr starken Einfluss des Metalls auf das Wachstum von *E. coli* hin. Zahlreiche Siderophore mit unterschiedlichen Strukturen waren durch Anthocyane hochreguliert, insbesondere Enterobaktin sowie Yersiniabaktin und Aerobaktin, wobei die beiden zuletzt genannten in dem apathogenen *E. coli* MG1655 nicht exprimiert werden (Anhang A13.1) (Abb. 37). Natürlicherweise sezernieren Bakterien unter Eisenmangelbedingungen diese Siderophore, die Fe^{3+} -Ionen mit einer hohen Affinität binden (Siderophilie) (Avdeef et al., 1978; Simon et al., 1995; Newton et al., 2010). Durch die metallkomplexierenden Eigenschaften der Anthocyane werden möglicherweise derartige Mangelbedingungen suggeriert und es entsteht eine starke Konkurrenz um das gebundene und freie Eisen (Fe), auf das die Bakterien angewiesen sind. Dabei ist die Bindung zwischen Anthocyanen und Fe^{3+} stärker, als zwischen Enterobaktin und Fe, was die enorme Hochregulierung der Siderophore erklärt (George et al., 1999). Der Eisengehalt im *Dakapo*-Beerenextrakt (ca. 13 $\mu\text{g/g}$; im Experiment eingesetzte Menge nach Einwaage: 0,121 ng/200 μl Well) (Hofmann, 2012) war vergleichsweise gering. Durch die im LB (*lysogeny broth*)-Medium

enthaltene Eisenmenge von 506,5 µg/l (101,3 ng/200 µl *Well*) steht durch das Nährmedium deutlich mehr Fe zur Verfügung, so dass *Dakapo* keine nennenswerte zusätzliche Eisenquelle darstellte. Doch durch die Zugabe von Eisen-komplexierenden Anthocyanen in *Dakapo* wurden vermutlich die Eisenaufnahmesysteme in EAHEC zur Aufnahme des im Nährmedium vorhandenen Fe stimuliert.

Aus der Komplexbildung der Anthocyane mit im Extrakt und im Medium enthaltenen Eisenionen resultierte die blaue Farbe der Substanz und der Versuchsansätze (Bayer, 1966). Eisenionen sind beispielsweise für die tiefblaue Farbe von Scheinmohn (*Meconopsis grandis*) verantwortlich (Yoshida et al., 2006). Durch die Verstoffwechselung des Fe änderte sich die Farbe des Mediums von blau nach grünlich, da Fe entzogen und von den Bakterien metabolisiert wurde (Abb. 32). Fe³⁺ wurde aufgenommen, durch die stark hochregulierte Ferrireduktase reduziert und der Zelle zum Wachstum bereitgestellt (Kap. 4.3.2.3). Aufgrund einer engmaschigen Regulierung des Eisenstoffwechsels durch zahlreiche Eisenakquisitionssysteme wurde nur so viel Fe aufgenommen, wie zum Wachstum benötigt wird (Chiancone et al., 2004). Die *fur*-regulierten Eisendicitrattansporter (FecA, FecB, FecC, FecD, FecE) wurden vermindert exprimiert (Kap. 4.3.2.4; Anhang A13.2), da Fe aus den Fe-Citrat-Komplexen schlecht lösbar ist und die Aufnahme von Fe mit höheren Energiekosten verbunden wäre.

Interessant war der Effekt von *Dakapo* auf die Serumresistenz in EAHEC, da das Traubenextrakt die inhibierende Wirkung von Humanserum vollständig aufheben konnte (Abb. 58). Serumresistenz beschreibt dabei die Fähigkeit der Bakterien im Blut zu überleben, was als ein Pathogenitätsmerkmal angesehen wird, da daraus eine Sepsis resultieren kann. Der apathogene Stamm *E. coli* MG1655 reagierte deutlich empfindlicher auf Humanserum und die kompensierende *Dakapo*-Wirkung war deutlich schwächer ausgeprägt (Anhang A10). Die zusätzlich in EAHEC im Gegensatz zu *E. coli* MG1655 exprimierten Siderophore Aerobaktin und Yersiniabaktin stellen eine Erklärung für die divergierenden Serum-Effekte bei diesen beiden Stämmen dar. Hinweise darauf gab das Experiment mit der *fur*-Mutante, da *Dakapo* bei dieser Mutante den Serumeffekt nicht aufzuheben vermochte (Abb. 59B). Viele der im Eisenstoffwechsel beteiligten Gene werden durch den Eisen-abhängigen Repressor Fur reguliert (Anhang A13), so dass die Ausschaltung dieses Gens die *Dakapo*-Wirkung stark verminderte (Abb. 59A). Unter Bedingungen eines ausreichenden Eisenangebotes bindet Fur an die Zielsequenzen im Promoter von Eisen-regulierten Genen und vermindert deren Expression (Skaar, 2010). Die Expression von *fur* war durch *Dakapo* nicht nennenswert verändert, aber *fur* ist für die engmaschige

Regulierung der Eisenhomöostase verantwortlich. Daher kann durch die Deletion dieses Gens die durch *Dakapo* positiv beeinflusste Eisenausnutzung nicht mehr optimal ablaufen, so dass der wachstumsinduzierende Effekt des Traubenextraktes bei der *fur*-Mutante erst nach einer gewissen Adaptationszeit sichtbar wurde und im Vergleich zum Wt nicht so stark ausgeprägt war (Abb. 59A). Die Reduzierung der Serumresistenz durch Anthocyan-haltige Beerenextrakte ist insbesondere bedeutsam vor dem Hintergrund, dass während der Epidemie 2011 mit Gastroenteritis und hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS), untypisch für EAHEC-Infektionen, überwiegend Frauen mit einer gesunden Ernährungsweise betroffen waren. In der Literatur wird von einer sehr geringen Bakteriendosis von EHEC ausgegangen, die zur Infektion führt (Fischer, 2014). Die vorliegenden *in vivo*-Experimente in *G. mellonella* zeigten jedoch, dass ein ESBL-*E. coli* aus Ägypten (*E. coli* CTX-M-15414) mit einer geringeren Dosis von $4 \cdot 10^5$ KBE/Larve (Abb. 20A) mehr Larven tötete, im Vergleich zu EAHEC (ST3305, Gießen) oder EHEC EDL933 bei einer Infektionsdosis von 10^6 KBE/Larve (Abb. 20B,C).

Anthocyane werden neben dem Einsatz als Lebensmittelfarbstoff E 163 (ohne Mengenbeschränkung; EFSA, 2013) verwendet, um die Farbe von Zierpflanzen zu modifizieren. Setzt man beispielsweise der Erde von Hortensien Fe zu, werden die Blüten blau. Bei Rosen funktioniert dies jedoch nicht, da Fe bereits mit anderen, stärker Fe-bindenden Substanzen wie Citrat Komplexe bildet. Dies bietet einen Erklärungsansatz für die Runterregulierung der *fur*-regulierten Eisendicitrattansporter (FecA, FecB, FecC, FecD, FecE), da Fe mit Citrat Komplexe bildet, aus denen das Metall nur schwer lösbar ist und die Aufnahme von Fe mit höheren Energiekosten verbunden wäre (Bayer, 1986; Kap. 4.3.2.4; Anhang A13.2).

Um eine Überladung der Bakterienzelle mit Fe zu verhindern, wurden die beiden Eisenspeicherproteine Bakterioferritin und Ferritin-like Protein 2 runterreguliert, so dass Fe nicht akkumulierte, sondern aufgenommen und zum Wachstum verwendet wurde. Zur Verhinderung von oxidativem Stress, der durch den vermehrten Metabolismus von an den Anthocyanen angeknüpften Zuckern entstehen könnte, waren die Mangan- und Kupfer-Zink-abhängigen Superoxiddismutasen, nicht jedoch die Fe-abhängige Superoxiddismutase, hochreguliert (Kap. 4.3.2.2; Anhang A13). Es wurde demnach vermehrt H_2O_2 gebildet, aufgrund der regulierten Eisenhomöostase entstanden jedoch keine OH^\bullet . Die für *E. coli* angenommene Konzentration von ungebundenem, freien Fe von 10-30 μM wird durch niedermolekulare, intrazelluläre Liganden, wie Ascorbat oder Citrat koordiniert und durch eine optimale Eisenaufnahme und -speicherung

gewährleistet (Perron & Brumaghim, 2009). Zuviel nicht-gebundenes, freies Fe würde intrazellulär zu oxidativem Stress führen (Rice-Evans, 1996).

Neben der Eisenhomöostase gab es ebenso Hinweise für einen sehr kontrolliert ablaufenden Energiegewinnungsprozess bei der Metabolisierung von Kohlenhydraten, da die 6-Phosphofruktokinase, das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Glykolyse, hochreguliert war, während Untereinheiten der Succinatdehydrogenase, ein im Citratzyklus und in der Atmungskette involviertes Enzym, durch *Dakapo* runterreguliert wurden (Kap. 4.3.2.1). Es bestand eine Hochregulierung verschiedenster Transporter für die optimale Nährstoffversorgung der Zelle. Transporter des Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferasesystem (PEP-PTS) zeigten jedoch keine veränderten Expressionsraten (Anhang A13). Die an die Anthocyane angelagerten Zucker wurden demnach in optimaler Menge aufgenommen und zum Wachstum genutzt, ohne dass oxidativer Stress durch die Atmungskette, wie bei Kohanski et al. (2007) beschrieben, entstand. Durch allgemeine Hochregulierung von verschiedenen Transportern (Abb. 34; Kap. 4.3.2.4), schien der Nährstofftransport optimiert zu werden, was eine Begründung für die Wachstumsinduktion ist.

Die bekannten antioxidativen Eigenschaften der Anthocyane scheinen in *E. coli* effektiv zu sein. Tatsächlich wurde oxidativer Stress vermindert, wie im Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)-Experiment und mit dem Hydroxyphenylfluorescein (HPF)-Farbstoff gezeigt werden konnte (Abb. 54; Abb. 55). Anthocyane können durch H₂O₂- oder Paraquat-bedingten oxidativen Stress effizient abfangen (Abb. 53). Hinweise darauf, dass Fe eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit der wachstumsinduzierenden Wirkung der Anthocyane spielt, zeigte das Experiment mit Malvidin-3-Glukosid (M-3-G), das kein Fe chelatiert und das Bakterienwachstum uneingeschränkt förderte, während es mit Delphinidin-3-Glukosid (D-3-G), einem Fe-komplexierenden Anthocyan, nach einer gewissen Zeit zu einer Einstellung der Wachstumsinduktion kam (Abb. 56; Kap. 4.6.2). Offenbar bestand eine Konkurrenz um das Fe im Medium, denn einerseits werden die Metallionen durch D-3-G komplexiert, andererseits durch die Siderophore aufgenommen, bis der Eisenanteil aufgebraucht ist und kein vermehrtes Bakterienwachstum mehr festzustellen war.

Dakapo ist eine sehr komplexe Substanz, die sich aus mehreren Anthocyanen zusammensetzt. Es konnte eine eindeutige Wachstumsstimulation in *E. coli* detektiert werden, sowohl mit diesem natürlichen Traubenextrakt, als auch mit den synthetisch hergestellten Einzel-Anthocyanen M-3-G und D-3-G. Andere Forschergruppen wie z.B. Lacombe et al. beschreiben jedoch wachstumshemmende Effekte durch Anthocyan-

reiche Cranberries (Lacombe et al., 2013) und Komponenten aus Heidelbeeren in *E. coli* (Lacombe et al., 2012). Anthocyan-haltigen Blüten- und Fruchtexttrakten von *Melastoma malabathricum* aus Malaysia waren gegen *L. monocytogenes* und *S. aureus* wirksam, wobei der Einfluss unterschiedlicher Temperaturen (4 °C; 25 °C; 37 °C) und pH-Werte (pH: 4, 6, 7, 8) untersucht wurde. *L. monocytogenes* war dabei gegenüber dem Blütenextrakt sensibler bei den pH-Werten 4, 6 und 7 bei allen Testtemperaturen, während *S. aureus* eher auf das Fruchtextrakt mit einer Wachstumsinhibition unter allen pH-Wert-Konditionen bei 25 °C und 37 °C reagierte, nicht jedoch bei 4 °C. Der pH-Wert und die Temperatur scheinen einen enormen Einfluss auf die Effizienz der Testsubstanzen zu haben, da die Anthocyane bei niedrigeren Temperaturen und pH-Werten stabiler sind (Che Omar et al., 2013). Wachstumsinhibitorische Wirkung hatte des Weiteren ein Anthocyan-haltiger Weintraubentrester in *Listeria innocua* und *E. coli* (Tseng & Zhao, 2012). Ebenso wurden von Cesoniene et al., (2009) antimikrobielle Effekte europäischer Anthocyan-reicher Cranberries gegenüber humanpathogenen Bakterien wie *L. monocytogenes*, *E. faecalis*, aber auch *E. coli*, *Salmonella typhimurium* und *S. aureus* gezeigt, wobei *Dakapo* gegenüber den letzten drei Bakterienspezies einen promikrobiellen Effekt hatte (Tab. 10; persönliche Mitteilung, Nora Würdemann, 2012). Inhibitorische Wirkungen verschiedenster Beerenextrakte wurden ebenso von Puupponen-Pimiä et al., (2005) gegenüber *Salmonella enterica* sv. *typhimurium* und *S. aureus* publiziert. Allerdings zeigten die Substanzen gegenüber *L. monocytogenes* keine Effekte, mit Ausnahme von Cranberries in höheren Konzentrationen, die das Wachstum von *L. monocytogenes* hemmten.

Eine Erklärung für diese divergierenden Beobachtungen im Vergleich mit *Dakapo* bietet die komplexe Zusammensetzung dieser Pflanzenstoffe aus verschiedensten Anthocyanen und anderen Komponenten wie organische Säuren, die Einfluss auf den pH-Wert nehmen (Puupponen-Pimiä et al., 2005). Des Weiteren spielen die Lagerungs- bzw. Wachstumstemperaturen eine wichtige Rolle, da die Anthocyane bei höheren Temperaturen zerfallen (Che Omar et al., 2013). Die unterschiedlichen Effekte der Einzel-Anthocyane aufgrund von deren verschiedenartigem Substitutionsmuster und Anzahl an Hydroxylgruppen im B-Ring (Abb. 6) sind nicht nur bei der Wirkung auf Mikroorganismen, sondern auch im Hinblick auf das krebsspräventive Potential bedeutsam, wobei die Hydroxylgruppen für den antikanzerogenen Effekt wichtig sind und Delphinidin die stärkste antiproliferative Wirkung zu haben scheint (Cooke et al., 2005). In der Humanernährung dominiert allgemein die Aufnahme der nicht-methylierten Anthocyanidine Cyanidin (~30 % Anteil an der Gesamtmenge der aufgenommenen Anthocyane), Delphinidin (~22 %), Pelargonidin (~18 %) im Gegensatz

zu den methylierten Anthocyane wie Peonidin (~7,5 %), Malvidin (~7,5 %) und Petunidin (~5 %) (Abb. 6B; Andersen & Markham, 2006). Die Versuche mit den synthetisch hergestellten Anthocyanen D-3-G und M-3-G zeigten, dass zwischen den Effekten einzelner Anthocyane differenziert werden muss (Abb. 56). Der Gehalt einzelner Anthocyane in *Dakapo* ist analysiert (Anhang A2) und diese spezifische Mischung aus Einzel-Anthocyanen, wie sie in dieser Traubensorte vorkommt, hatte einen eindeutigen, probakteriellen Effekt auf das Wachstum von *E. coli* wie die Experimente zeigten (Abb. 11; Tab. 10).

Einen wachstumsinduzierenden Effekt hatte *Dakapo* ebenso auf *E. coli*, die unter Nährstoffmangelbedingungen über zwei Jahre (720 Tage) in verschiedenen, autoklavierten Gewässern gehalten wurden. Dabei waren Unterschiede in Abhängigkeit von den Temperaturkonditionen, denen die Bakterien ausgesetzt waren, festzustellen. Bei 4 °C war der *Dakapo*-Effekt erst nach 24 Stunden sichtbar, wenn die Bakterien in LB-Nährmedium und Zugabe des Beerenextraktes angezüchtet wurden, während die verhältnismäßige Wachstumsinduktion durch *Dakapo* bei den bei 20 °C in den Gewässern inkubierten Bakterien schon nach 16 Stunden detektiert werden konnte (Abb. 63). Das Reanimationsexperiment wurde bei 37 °C durchgeführt. Daher mussten sich die Bakterien zunächst an diese höhere Temperatur anpassen, was einige Zeit in Anspruch nahm. Nach 86 Wochen konnte EAHEC aus OW (4 °C) durch Anzucht mit *Dakapo* wiederbelebt werden, was bei den FL- und LW-Ansätzen zu diesem Zeitpunkt nicht mehr möglich war. Offenbar ist der Zeitpunkt des Wiederbelebungsversuches entscheidend, denn bei der Wiederholung des Reanimationsexperimentes eine Woche später führte die *Dakapo*-Behandlung auch in OW nicht zu einer Wiederbelebung von EAHEC, da sich die Bakterien nicht mehr in einem *viable-but-not-culturable* (VBNC)-Zustand befanden, sondern tot waren.

Bei 4 °C (Abb. 60A) schien *E. coli* zunächst in allen Gewässern besser zu überleben als bei 20 °C, langfristig jedoch waren 20 °C optimaler (Abb. 60B; Abb. 61). Aurass et al. (2011) führten ein ähnliches Experiment, allerdings nur mit zwei Leitungswasserproben aus zwei Städten, über 40 Tage durch und stellten dabei eine bessere Überlebensfähigkeit der Bakterien bei 4 °C fest. In der vorliegenden Langzeitstudie über zwei Jahre zeigte sich jedoch, dass sowohl der nicht-pathogene *E. coli* ECO1080 K12 als auch EAHEC (2011) bei der höheren Temperatur persistenter waren. Im Oberflächengewässer (OW) waren dabei die meisten Nährstoffe verfügbar, gefolgt von Fließgewässer (FL) und Leitungswasser (LW), was bei den kühleren, eher natürlichen Bedingungen deutlich wurde, während bei 20 °C keine Unterschiede zwischen den Gewässern festzustellen waren (Abb. 61). Dies zeigte sich insbesondere nach 720 Tagen bei EAHEC, wobei sich OW als das optimalste Wasser

rauskristallisierte, da die Bakterien in OW auch bei 4 °C noch sehr lange überlebensfähig waren (Abb. 60A; Anhang A11). Temperaturunabhängig war das Auftreten von sehr kleinen Mikrokolonien insbesondere im FL festzustellen, nicht jedoch bei LW. Nach 720 Tagen waren die Bakterien in allen Gewässern bei 4 °C abgestorben. In den bei 20 °C beobachteten Wasseransätzen überlebte EAHEC tendenziell in allen Gewässern besser als *E. coli* K12 (Abb. 61). In keinem der Gewässer kam es zu einem Verlust der Resistenzeigenschaften von EAHEC, wie auch bei Aurass et al. (2011) beschrieben, da sich die Bakterien auf CTX (2 µg/ml)-enthaltenden LB-Agarplatten kultivieren ließen (Abb. 64). EAHEC im VBNC-Zustand trägt nach wie vor alle Charakteristika des Ausbruchsstammes und ist zur Shiga-Toxin (STX-2)-Produktion befähigt. Es kommt weder zu genetischen Veränderungen noch zu einem modifizierten Plasmidprofil, allerdings sind die Bakterien im VBNC-Zustand signifikant kleiner (1,2 µm Länge, 0,8 µm Durchmesser) im Vergleich zu den parentalen bzw. wiederbelebten Bakterienzellen (1,4 µm Länge, 0,9 µm Durchmesser) (Aurass et al., 2011). Die Wachstumsinduktion durch *Dakapo* war bei allen Wasseransätzen temperaturunabhängig gleichermaßen ausgeprägt (Abb. 63). Geht man davon aus, dass sich der hochpathogene EAHEC in einen VBNC-Zustand zurückziehen kann und in diesem in der Umwelt persistiert, ist es im Hinblick auf klinische Ausbrüche mit Krankheitserregern bedeutsam, dass natürliche Substanzen wie Beerenextrakte das Wachstum dieser Bakterien fördern können. Dies hat ebenso Relevanz für die Spurensuche der Erreger in Lebensmitteln.

Effekte von *Dakapo* auf *L. monocytogenes*

Der wachstumshemmende Effekt von *Dakapo* auf *L. monocytogenes* ist insbesondere deshalb interessant, da er durch subletale Konzentrationen von Antibiotika potenziert werden kann. Dies stellt einen Einstieg in eine weitreichende Diskussion für die Wirkmechanismen von *Dakapo* und den Antibiotika dar. Für bakterizide Antibiotika werden von verschiedenen Forschergruppen scheinbar widersprüchliche Wirkmechanismen postuliert. Einerseits wird angenommen, dass bakterizide Antibiotika über die Bildung von ROS effektiv sind durch Aktivierung eines Stoffwechselweges, bei dem durch den Citratzyklus, eine NADH-Depletion, die Elektronentransportkette und Fe-katalysierten Fenton-Reaktion oxidativen Stress erzeugt wird (wie im Versuch mit HPF für Ampicillin und Ciprofloxacin gezeigt) (Abb. 54), woraus letztlich letale DNA-Doppelstrangbrüche resultieren (Lee & Collins, 2011; Kohanski et al., 2007; Kohanski, 2010a; Kohanski, 2010b; Dwyer et al., 2009). Im Gegensatz dazu zeigten andere Forschergruppen, dass bakterizide Antibiotika auch unter anaeroben Bedingungen wirksam sind, z.B. Ampicillin, Norfloxacin und

Kanamycin nicht zur ROS-Bildung führen und Chelatoren nur bei geringen Antibiotikakonzentrationen protektiv sind (Liu & Imlay, 2013; Keren et al., 2013, Abb. 69).

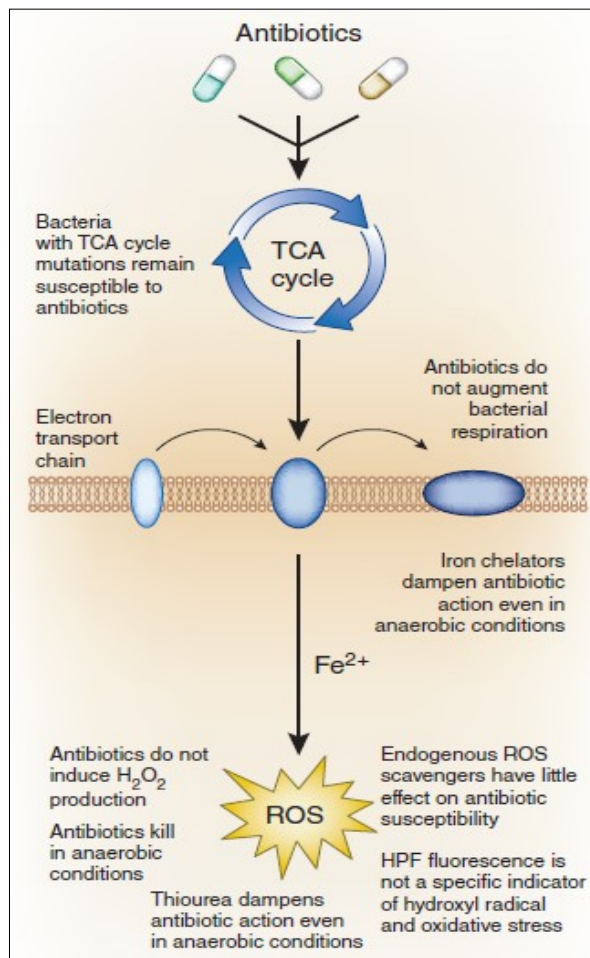


Abb. 69: Darstellung der divergierenden Aspekte des antibiotischen ROS-Paradigmas (Fang, 2013)

Erklärungen für diese divergierenden Effekte könnten unterschiedliche Wachstumsbedingungen, Antibiotikakonzentrationen und die limitierten Möglichkeiten zur spezifischen Messung von oxidativem Stress sein, der aus einem Ungleichgewicht von ROS und antioxidativen Mechanismen der Zelle entsteht und einen dynamischen Prozess darstellt. Fang (2013) postuliert, dass ROS den antiinfektiven Effekt von Antibiotika unter bestimmten experimentellen Bedingungen potenzieren, aber nicht verantwortlich für diesen sind. Komplexe Interaktionen von Kohlenhydratmetabolismus, antioxi-

dativen Abwehrmechanismen und der Eisenhomöostase sind dabei relevante Einflussfaktoren, die es weiter zu untersuchen gilt, und die im Hinblick auf Wachstumsinhibition durch *Dakapo* in *L. monocytogenes* relevant sind.

Einfluss von Eisen auf den *Dakapo*-Effekt

Die beschriebenen Beobachtungen mit bakteriziden Antibiotika stellen Ansätze für Annahmen und Erklärungen des inhibitorischen Effekts von *Dakapo* gegenüber *L. monocytogenes* dar. Diese beruhen auf oxidativem Stress, wobei das Sauerstoffangebot, die Kohlenhydratquelle, Eisenionen und verschiedene Enzyme wie β -Glukosidasen und die Pyruvatdehydrogenase (*pdh*) bedeutsam sind. Die Reaktion auf *Dakapo* war dabei sehr komplex, da sich das Beerenextrakt aus verschiedenen Anthocyanen zusammensetzt, die in Abhängigkeit von der jeweiligen chemischen Struktur unterschiedliche Wirkungen auf das Wachstum zeigten. Dabei wurden synthetisch hergestellte Einzel-Anthocyane untersucht. Fe-chelatierende Anthocyane wie D-3-G hatten keinen hemmenden Effekt auf das Wachstum, was auf einen

weitreichenden Einfluss dieser Metallionen auf den oxidativen Stress in der Zelle hindeutete, während das nicht-Fe-komplexierende Anthocyan M-3-G für den wachstumsinhibitorischen Effekt von *Dakapo* verantwortlich war (Abb. 46). Im Falle von M-3-G wurde freies Fe aufgenommen, was oxidativen Stress förderte. Beim D-3-G fand hingegen durch die Chelatbildung eine kontrollierte Eisenaufnahme statt.

Fri, das Eisenspeicherprotein war durch *Dakapo* hochreguliert, was auf die Akkumulation des Metalls und Dysregulierung der Eisenhomöostase in der Zelle hinwies (Kap. 4.3.1.3; Anhang A12.1). Dadurch steht Fe für die Fenton-Reaktion zur Verfügung. Normalerweise schützt Fri die DNA vor oxidativem Schaden durch Speicherung von intrazellulärem Fe (Fe^{3+}). Dadurch wird die Fenton-Reaktion verhindert, aber aufgrund der enormen Dysregulierung innerhalb der Zelle ist es denkbar, dass Fe aus den Eisenspeicherproteinen freigesetzt wurde und die ROS-Bildung förderte. Für Anthocyane werden neben den vielfach beschriebenen antioxidativen Eigenschaften ebenso prooxidative Aktivitäten genannt. Denn Anthocyane können an Fe^{3+} binden, dieses reduzieren, so dass Fe^{2+} für die Fenton-Reaktion verfügbar ist (Perron & Brumaghim, 2009). Eisensupplementation in Kombination mit *Dakapo* potenzierte den inhibitorischen Effekt des Beerenextraktes, während Fe-III-Citrat alleine keine Auswirkung auf das Wachstum hatte (Abb. 48). Der Test mit den synthetischen Anthocyanen zeigte, dass D-3-G beim Wt für diesen durch Fe potenzierten, inhibitorischen Effekt verantwortlich war und Fe auf die beschriebene inhibitorische Wirkung von M-3-G keinen Einfluss hatte (Abb. 49). Offenbar führte die Zugabe von zusätzlichem Fe zur Fe-komplexierenden Substanz D-3-G zu oxidativem Stress.

Abbau von Zuckern führt zu oxidativem Stress

Neben der Verfügbarkeit von Fe als Komponente für die Entstehung von oxidativem Stress, ist die Abspaltung von mit den Anthocyanen verknüpften Zuckern verantwortlich für die ROS-Bildung. Die starke Stimulierung von β -Glukosidasen in *L. monocytogenes* (Abb. 31), deren Aktivität im Enzymassay nachgewiesen wurde (Abb. 40), deutete darauf hin, dass die Degradation von gebundenen Zuckerhälften zu oxidativem Stress durch glykolytischen Abbau führte. Die schrittweise Degradation von Kohlenhydraten via Glykolyse, Citratzyklus und Atmungskette resultierte in der Produktion von freien Radikalen, die toxisch für die Zelle sind (Abb. 69). Die starke Metabolisierung der Anthocyane in *L. monocytogenes* zeigte sich ebenso phänotypisch durch eine enorme Veränderung der Farbe des durch *Dakapo* blau gefärbten Mediums, das nach den Versuchen eine bräunliche Farbe annahm (Abb. 27). Hinweise für eine Hochregulierung der Glykolyse gab die Transkriptomanalyse. Die

Hochregulierungen der Phosphoglyceratmutase (*Imo0517*: Interkonversion von 2-Phosphoglycerat und 3-Phosphoglycerat), der Succinatdehydrogenaseaktivität (*Imo0355*) und ATP-Synthase (*atpE*, *atpF*) zeigten die Stimulierung dieses Abbauweges (Kap. 4.3.1.1; Anhang A12.1). Dies führte zur Depletion von Reduktionsäquivalenten (NADH), einer Hyperaktivierung der Atmungskette, ATP-Produktion und Stimulierung der $O_2^{\bullet-}$ -Bildung. Dadurch können Fe-Schwefel-Cluster geschädigt und reduziertes Fe freigesetzt werden, das via Fenton-Reaktion oxidiert wird (Kohanski et al., 2007). Die Annahme der induzierten ROS-Bildung durch *Dakapo* unterstrich das PFGE-Experiment (Abb. 45). Durch ROS-Bildung entstanden vermehrt DNA-Doppelstrangbrüche, die DNA wurde zerstört und wanderte in das Gel, während bei der unbehandelten und bei der mit H_2O_2 -behandelten Probe nur sehr schwache Banden sichtbar waren. Offenbar war der durch *Dakapo* verursachte oxidative Stress konzentrationsabhängig stärker und langlebiger, als der durch H_2O_2 -induzierte Stress. Die H_2O_2 -Konzentration und Dauer der Behandlung spielten eine Rolle und bieten eine Erklärung für die nur schwachen Bande nach H_2O_2 -Behandlung. Die Transkriptomdatenanalyse zeigte, dass die Bakterienzelle als Reaktion auf eine Behandlung mit *Dakapo* versucht Doppelstrangbrüche zu reparieren, da viele Reparaturmechanismen und Enzyme der Stressantwort induziert waren. Die allgemeine Hochregulierung der Stressantwort deutete auf Regulationsmechanismen in der Zelle hin, um durch *Dakapo*-induzierten Stress abzufangen, allerdings funktionierte dies nicht effizient. *Lmo2705* und *Imo2267*, die für ATP-abhängige Helikasen kodieren und die fähig sind, DNA-Doppelstrangbrüche zu reparieren, wiesen eine erhöhte Expressionsrate auf. Ebenso waren Kälteschockproteine wie das CspL- und CspD-Protein, Regulatoren von temperaturabhängigen Stressbedingungen und *Imo0942*, das als Antwort auf Stress induziert wird, hochreguliert. Die Induktion der DNA-Reparatur, angezeigt durch erhöhte Expressionen von *recX*, *recO*, *dinG* oder *recU* und von vielen weiteren Proteinen der DNA-Reparatur und -Rekombination, deutete auf erhöhte Stressbedingungen nach *Dakapo*-Supplementation hin (Abb. 29; Kap. 4.3.1.2; Anhang A12.1). Sauerstoffverminderung verbesserte das Wachstum von *L. monocytogenes*, die auf mit *Dakapo*-beschichteten Agarplatten kultiviert wurden, im Vergleich zum Wachstum unter aeroben Bedingungen (Abb. 41). Unter aeroben Bedingungen nutzten *L. monocytogenes* sowohl die homofermentative Fermentation durch Substratkettenphosphorylierung als auch die aerobe Respiration zur Energiegewinnung. Diese ist charakterisiert durch die chemiosmotische Bewegung der Protonen durch die ATP-Synthase als das finale Enzym der oxidativen Phosphorylierung. Anaerob, durch Substratkettenphosphorylierung, ist die ATP-Generation unabhängig von Elektronenakzeptoren oder zellulärer Respiration. Dadurch

kann der Citratzyklus und eine potenzielle ROS-Bildung umgangen werden (Nilsson et al., 2013). Mit Glycerin anstelle von Glukose als Kohlenhydratquelle im Minimalmedium (MM), das mit *Dakapo* supplementiert war, wuchs *L. monocytogenes* besser, was wiederum zeigte, dass die Metabolisierung von verknüpften Zuckern Stress induzierte (Abb. 42).

Thiolstress wird durch *Dakapo* vermindert

Neben oxidativem Stress durch nicht-komplexiertes Fe und durch Abbau von vermehrtem Zuckerangebot, zeigte sich ein dritter, überlagernder Effekt durch die Anthocyan-Supplementation. Denn Anthocyane scheinen Thiolstress in der Bakterienzelle zu reduzieren. Die Runterregulierung von *spx*, dem Hauptregulator von Thiolstress, deutete darauf hin (Kap. 4.3.1.2). *Spx* ist in Gram-positiven Bakterien mit einem geringen-GC-Gehalt hochkonserviert und spielt für die Aufrechterhaltung der Redoxhomöostase unter Disulfidstress-Bedingungen eine wichtige Rolle. *Spx* reguliert die Expression einiger in die Stressantwort involvierter Gene. In der Spezies *Bacillus subtilis*, die eng verwandt mit *L. monocytogenes* ist, sind viele Gene der Stressantwort unter der Kontrolle von *spx* reguliert, wie *dps*, *gor* (Glutathionreduktase), *katA* (Häm-abhängige Katalase), *sodA* (Superoxiddismutase), *tpx* (Thiolperoxidase) und *trxB* (Thioredoxinreduktase) (Kajfasz et al., 2012). Durch die verminderte Expression von *spx* wurden die eigenen antioxidativen Enzyme in *L. monocytogenes* durch *Dakapo*, wie Superoxiddismutase und die Glutathionperoxidase, vermindert exprimiert (Anhang A12.2). Da die Anthocyane $O_2^{\bullet-}$ zu H_2O_2 umwandeln können, haben sie eine ähnliche Funktion wie die Superoxiddismutase (Perron & Brumaghim, 2009). Dies könnte ebenso die Runterregulierung dieses Enzyms erklären. Allerdings kann aus $O_2^{\bullet-}$ dennoch H_2O_2 gebildet werden, da die Gene nicht vollständig ausgeschaltet sind. Neben *Dakapo* wurde weiterhin der Effekt von Catechol, einem möglichen Abbaumetabolit der Anthocyane, untersucht. Catechole können beim Katabolismus aromatischer Substanzen wie Anthocyane gebildet werden. Catecholphälfen treten in Fe-chelatierenden Anthocyanen wie Cyanidin, Delphinidin oder Petunidin auf (Abb. 6B). Sie sind gute Eisenchelatoren und haben dadurch antioxidative Eigenschaften. Allerdings verursachen Catechole thiolspezifische Stressbedingungen und werden durch spezifische, ringspaltende Dioxygenase zu ortho- und para-Benzoquinonen in Gegenwart von O_2 metabolisiert (Leelakriangsak et al., 2008; Vaillancourt et al., 2006; Liebeke et al., 2008). Diese thiolspezifischen Stressbedingungen konnten durch *Dakapo* kompensiert werden. Hohe Catechol-Konzentrationen im mM-Bereich, die ebenso getestet wurden, hatten in *L. monocytogenes* jedoch eine vergleichbare wachstumshemmende Wirkung wie

Dakapo (Abb. 51). Catechole werden zu Metaboliten wie Acetyl-CoA abgebaut, die in den Citratzyklus einfließen (Abb. 70; Caspi et al., 2012).

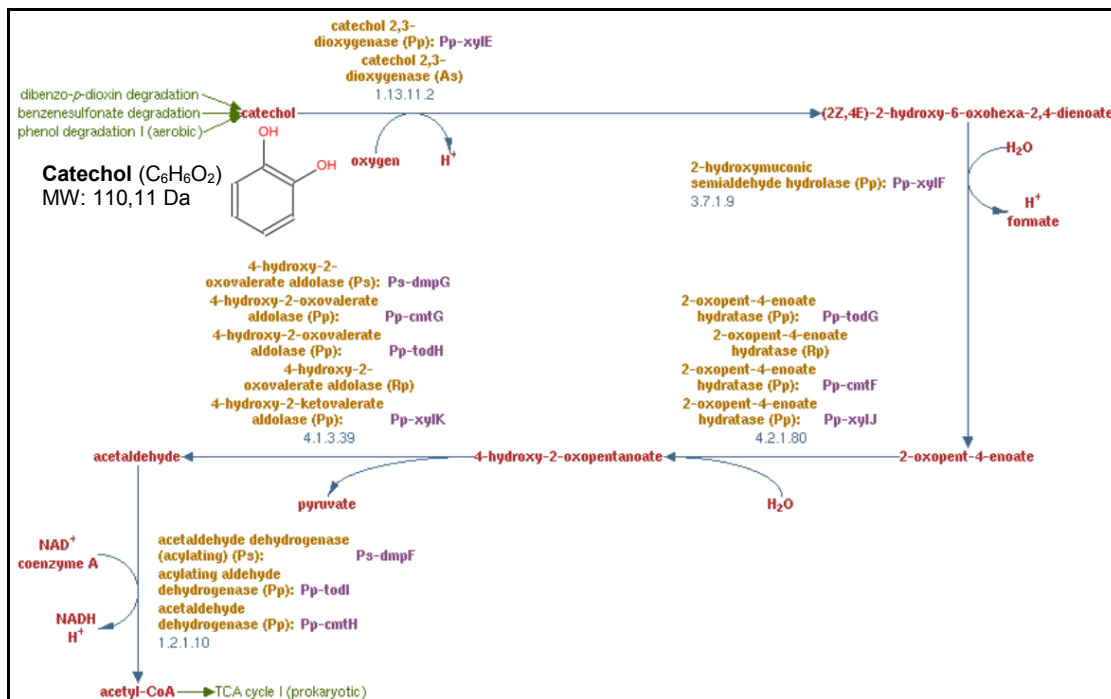


Abb. 70: Abbau von Catechol zu Acetyl-CoA
(Caspi et al., 2012)

Testungen mit Mutanten geben Hinweise auf Wirkmechanismen

Zur Erklärung der interagierenden und überlagernden *Dakapo*-Effekte wurden Experimente mit verschiedenen Mutanten von *L. monocytogenes* durchgeführt (Tab. 3; Kap. 4.5.4) und ebenso die Wirkung einer Eisensupplementierung und von synthetischen Einzel-Anthocyane untersucht. Aufschlussreich war das Ergebnis mit der Δ sodA-Mutante von *L. monocytogenes*, die unbehandelt ein schlechteres Wachstum zeigte als der Wt (Abb. 44). *Dakapo* hat einen verhältnismäßig gleichen hemmenden Effekt wie beim Wt. Beide Einzel-Anthocyan-Substanzen (D-3-G und M-3-G) verminderten das Wachstum der Δ sodA-Mutante jedoch drastisch, was darauf hindeutet, dass die Superoxiddismutase oxidativen Stress verminderte, wozu die Anthocyan-Einzelsubstanzen in diesem Fall nicht fähig waren. Mit M-3-G war das Wachstum fast vollständig inhibiert, während es mit D-3-G stark eingeschränkt war (Abb. 47). Beim Wt hingegen hatte das Fe-chelatierende Anthocyan D-3-G keinen Effekt (Abb. 46). Dies zeigte, dass die Kombination von freiem Fe, einem Überangebot an Zuckern, die via glykolytischem Abbauweg degradiert wurden, und eingeschränkten, Radikal-abfangenden Systemen für die Bakterienzelle tödlich waren. Interessanterweise führte jedoch eine Zugabe von Fe-III-Citrat zur Δ sodA-Mutante zu einer starken Wachstumsstimulation, die den hemmenden Effekt von beiden Anthocyanen aufhob (Abb. 49C,D). Fe schien für diese Mutante ein Wachstumsfaktor

zu sein, der aufgrund der verminderten Bildung von H_2O_2 , da die Superoxiddismutase deletiert ist, nicht zur OH^\bullet -Bildung via Fenton-Reaktion führte. Auf der Suche nach den Wirkmechanismen wurde *Dakapo* an verschiedenen weiteren Mutanten getestet (Kap. 4.5.4). Bei allen zeigte sich der gleiche Effekt wie im Wt mit Ausnahme von $\Delta lmo1054$, wobei das ausgeschaltete Gen die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA zwischen Glykolyse und dem Citratzyklus katalysiert (Abb. 43). Für den *Dakapo*-Effekt scheint dies das Schlüsselenzym zu sein, was die Hypothese der ROS-Bildung durch Zuckerabbau im Citratzyklus und der Atmungskette stützt. Werden die Kohlenhydrate nicht über diesen Weg abgebaut, sondern in alternative Abbauewege wie den Pentosephosphatzyklus eingeschleust, entsteht kein oxidativer Stress und das Wachstum dieser Mutante wurde durch die komplexe *Dakapo*-Substanz nicht beeinträchtigt. Auf die $\Delta lmo1978$ -Deletionsmutante (*lmo1978* kodiert für die Glukose-6-phosphat-1-dehydrogenase, die die Reaktion β -D-Glukose-6-phosphat \rightarrow D-Glukono-1,5-lakton-6-phosphat im Pentosephosphatzyklus katalysiert) hatten die Einzel-Anthocyane D-3-G und M-3-G hingegen den gleichen inhibitorischen Effekt wie im Wt (Abb. 46; Abb. 47). Die Zuckerdegradation läuft bei dieser Mutante vermutlich über den glykolytischen Abbaueweg ab.

***Dakapo* und Abbauprodukte der Anthocyane potenzieren den Effekt von verschiedenen Antibiotika**

Es stellte sich die Frage, ob bei einer Substanz wie *Dakapo*, die einen wachstumshemmenden Effekt gegenüber *L. monocytogenes* zeigte, subletale Konzentrationen von gegenüber *L. monocytogenes* wirksamen Antibiotika diese Wachstumsinhibition verstärken können. Die Induktion von *lmo0540* (Kap. 4.3.1.5), einem Gen, das als ähnlich dem Penicillin-bindenden Protein beschrieben wird, lieferte einen Erklärungsansatz für die bessere Wirksamkeit von Penicillin in Kombination mit *Dakapo* (Abb. 50; Anhang A12.1). Ebenso wurde die Wirksamkeit der Gyrasehemmer Ciprofloxacin und Nalidixinsäure durch das Traubenextrakt verstärkt (Anhang A9). Targets in der Zelle für Antibiotika werden demnach durch *Dakapo* modifiziert, so dass die Antibiotika effizienter sind. Ähnliche Effekte konnten durch Catechole in Kombination mit Antibiotika detektiert werden, die die hemmende Wirkung der Pharmaka verstärkten (Abb. 51). Die genauen molekularen Mechanismen können im Rahmen der vorliegenden Analyse nicht aufgeschlüsselt werden, sondern müssten in weiteren Transkriptomanalysen nach Kombinationsbehandlung mit *Dakapo* und den verschiedenen Antibiotika untersucht werden. Allerdings bietet der potenzierende Effekt des Anthocyan-reichen Traubenextraktes bei der Behandlung mit verschiedenen Antibiotika einen bedeutsamen Ansatzpunkt im Hinblick auf die Therapie einer

Listerieninfektion. Im Besonderen, da Anthocyan-haltige Lebensmittel (natürliche Anthocyane oder als E 163) mit der Nahrung aufgenommen werden bzw. sehr Anthocyan-reichhaltige Fruchtsäfte ergänzend zur Antibiose bei einer Infektion mit Listerien getrunken werden könnten.

Komparative Diskussion und Zusammenfassung der *Dakapo*-Effekte

Die Interaktionen zwischen Anthocyanen, ROS und Fe sind sehr komplex. Offenbar spielen das Anthocyan-Muster, die Aufnahme, der Metabolismus und die Interaktionen mit Metallen eine wesentliche Rolle. Einige Bakterienspezies wie *L. monocytogenes* können das reichhaltige Nährstoffangebot durch die Zuckerverknüpfungen der Anthocyane nicht adäquat metabolisieren und bei deren Abbau entsteht oxidativer Stress. Bei anderen Spezies wie *E. coli* entfalten die Anthocyane jedoch ihr antioxidatives Potential. In Tab. 13 ist die Integration der vorliegenden Transkriptomdaten zu *L. monocytogenes* und EAHEC dargestellt, die die Komplexität der Reaktionen auf *Dakapo* in einer Übersicht darstellt.

Tab. 13: Integration der Effekte durch *Dakapo* in *L. monocytogenes* und EAHEC

	<i>L. monocytogenes</i> EGD-e (Wt) (Gram-positiv)	EAHEC (ST3305, Gießen) (Gram-negativ)
Gesamtzahl der analysierten Gene	3.090	5.276
Zahl der induzierten Gene	238	95
Zahl der inhibierten Gene	91	199
metabolischer Stress, Zuckerabbau	+++	+
Eisenspeicherung	+++	---
Eisenaufnahme	0	+++
Thiol-Stress	-	+
Wachstum	Inhibition↓	Induktion↑

Anzahl der regulierten Gene unter den gesetzten Kriterien „mindestens 10 reads, fold change: $\leq -1,9$ bzw. $\geq +1,9$ “.

Legende: Inhibition (schwach: - ; stark: ---), Induktion (schwach: + ; stark: +++), 0 kein Effekt.

Es zeigten sich eine völlig gegensätzliche Datenlage und gegenläufige Reaktionen beim Vergleich der Transkriptomdaten von *L. monocytogenes* und EAHEC. In *L. monocytogenes* waren verhältnismäßig mehr Gene hoch- (238 Gene) als runterreguliert (91 Gene), in EAHEC mehr Gene inhibiert (199 Gene) als induziert (95 Gene). Während in EAHEC die Eisenaufnahmesysteme stark stimuliert waren, fanden sich in *L. monocytogenes* keine Hinweise auf starke Veränderungen in Bezug auf die Aufnahme dieser Metallionen. Allerdings war die Eisenspeicherung in *L. monocytogenes* induziert, angezeigt durch die Hochregulierung von Fri, während in EAHEC die beiden Eisenspeicherproteine Ferritin-like Protein 2 und Bacterioferritin stark supprimiert waren (Tab. 13). Eine Akkumulation von Eisen in der Zelle fördert die Entstehung von oxidativem Stress über die Fenton-Reaktion. Eisen ist ein wichtiger

Wachstumsfaktor für Bakterien, aber zu viel Eisen wirkt toxisch, so dass eine engmaschige Regulierung der Eisenhomöostase unabdingbar für ein optimales Bakterienwachstum ist. In *E. coli* scheint die Eisenhomöostase durch die Regulation des Gens *fur* optimiert zu werden. Die deutliche Induktion der Eisenaufnahmesysteme Enterobaktin, Yersiniabaktin und Aerobaktin durch *Dakapo* förderte das Wachstum von EAHEC, ohne dass durch den Abbau der komplexen Anthocyane mit verknüpften Zuckern oxidativer Stress entstand. Für die untersuchten weiteren Bakterienspezies wie in Tab. 10 dargestellt, werden ähnliche Mechanismen angenommen, die möglicherweise auf der Entstehung von oxidativem Stress durch vermehrten Zuckerabbau (Enterokokken, Streptokokken) oder auf einer nicht optimierten Eisenhomöostase (*Y. enterocolitica*) beruhen. Alle weiteren getesteten Spezies der *Enterobacteriaceae* wurden in ihrem Wachstum durch die Anthocyan-haltigen Beerenextrakte gefördert, ebenso wie verschiedene Stämme von *S. aureus* (Tab. 10; persönliche Mitteilung, Nora Würdemann, 2012). Zur Aufklärung der genauen Mechanismen bedarf es weiterer Transkriptomexperimente.

Wichtig ist zuletzt die Bemerkung, dass es sich bei Transkriptomanalysen nur um eine Momentaufnahme handelt und die Lebenszeit der mRNA sehr kurz ist (wenige Minuten). Deshalb wurden im Rahmen der vorliegenden Analysen ebenso eine qRT-PCR von selektierten Genen (Kap. 4.4) und ein biochemischer Assay (Glukosidase-Assay; Kap. 4.5.1) durchgeführt. Transkriptomdaten sind komplex, heutzutage relativ schnell produziert, aber aufwendig zu analysieren und zu interpretieren. Ebenso gibt die Hoch- bzw. Runterregulierung einzelner Gene noch keine Gewissheit für die tatsächliche Translation eines Proteins und die Aktivität der Enzyme. Vor diesem Hintergrund wird anhand der vorliegenden Transkriptomdaten folgendes als Reaktion auf die *Dakapo*-Behandlung postuliert:

- *L. monocytogenes* EGD-e (Wt) ist sensitiv gegenüber durch *Dakapo*-induzierten oxidativen Stress. Der Metabolismus des vermehrten Zuckerangebots durch β -Glukosidasen und glykolytischem Abbauweg, in Kombination mit einer Dysregulierung der Eisenhomöostase unter aeroben Bedingungen bedingt diesen oxidativen Stress.
- Diese komplexen und interabhängigen Daten zeigen, dass Anthocyan-reiche Substanzen zu einer enormen Veränderung im Zellmetabolismus führen, wobei die Unterscheidung zwischen einzelnen Anthocyanen (Metallkomplexbildungsfähigkeit) wichtig ist, da M-3-G und nicht D-3-G für die Wachstumsinhibition verantwortlich ist.

- In *E. coli* hingegen entfalten Anthocyane ihre antioxidativen Eigenschaften, bei gleichzeitiger Optimierung der Eisenhomöostase, Energiegewinnung und Erhöhung der Serumresistenz.
- *Dakapo* stimuliert das Wachstum bei *E. coli*, die aus dem VBNC-Zustand nach Inkubation über zwei Jahre (720 Tage) in verschiedenen Gewässern wiederbelebt werden. Dies unterstreicht den sehr stark ausgeprägten, wachstumsinduzierenden Effekt des Traubenextraktes.

5.4 Ausblick

Auf der Suche nach neuen Wirksubstanzen gegenüber multiresistenten Bakterien bieten Insekten ein enormes Reservoir, das es weiter zu entdecken gilt. AMP wie *Defensin Tca1* sind wirksam gegenüber MRSA und *L. monocytogenes* oder *Stomoxyn* gegen multiresistente Stämme von *E. coli* und *K. pneumoniae*. Denkbar wäre eine chemische Modifikation der AMP z.B. durch Glykosilierungen, Amidierungen oder intramolekulare Disulfidbrücken, um die Effizienz der AMP zu erhöhen (Gobbo et al., 2002). Die einzelnen AMP, Interaktionen verschiedener AMP und der Effekt von AMP auf die Wirkung von Antibiotika müssen in Vertebraten-Tiermodellen im Hinblick auf MHK und den Einsatz bei humanen Infektionen weiter getestet werden. Dabei müssen die *in vivo*-Toxizität, die Stabilität und Bioverfügbarkeit und die allgemeine Gefahr der Resistenzentwicklung gegen antimikrobiell wirksame Substanzen berücksichtigt werden (Bulet et al., 2004).

Im Gegensatz zu den Insekten-AMP gelangen Anthocyane als natürliche (z.B. in Obst, Gemüse und Rotwein) und zugesetzte (E 163) Bestandteile der humanen Nahrung in den Darm, wo sie verstoffwechselt und aufgenommen werden (He & Giusti, 2010). Aufgrund der wachstumshemmenden und Antibiotika-potenzierenden Effekte von *Dakapo* gegenüber *L. monocytogenes* stellt sich die Frage, inwiefern eine Verwendung von Anthocyanen zur Prävention und Therapie einer Listerieninfektion sinnvoll ist. Denkbar ist der Einsatz von isolierten, nicht-Fe-chelatierenden Anthocyanen wie M-3-G oder von komplex, zusammengesetzten, natürlichen Anthocyan-reichen Substanzen wie Beerenextrakten. Diese könnten als Additive Lebensmitteln wie z.B. Käse, zugesetzt werden, um das Risiko einer Listerieninfektion zu vermindern oder eine solche zu verhindern. Nach dem Vorscreening im *G. mellonella*-Infektions- und Zellkulturmodell sind weitere Forschungsaktivitäten mit Anthocyan-reichen Substanzen in anderen Tiermodellen und Humanstudien von großem Interesse. Die Substanzen könnten als Adjuvantia eingesetzt werden, um die medizinische Antibiotikatherapie bei einer Listerieninfektion zu unterstützen.

Allerdings bleibt zu beachten, dass Anthocyane das Wachstum anderer pathogener Bakterien induzieren. Beim Ausbruch der EAHEC-Epidemie 2011 waren insbesondere Frauen mit einer überwiegend gesunden, (Anthocyan-reichen) Ernährung betroffen. Möglicherweise können Anthocyane durch die Überexpression von Eisenaufnahmesystemen und damit verbundener Wachstumsinduktion die dramatische Vermehrung der Bakterien mitbegünstigt haben. *In vitro*- und *in vivo*-Experimente im Minimalmedium mit einer definierten Eisenmenge, Versuche mit nativem und Hitze-inaktiviertem Humanserum und weiteren Mutanten von *E. coli* sind von Interesse, um die genauen Mechanismen des *Dakapo*-Effektes zu ergründen. Das Wissen des wachstumsinduzierenden Effekts von Beerenextrakten gegenüber pathogenen Bakterien kann in der Diagnostik eingesetzt werden, um hochpathogene Erreger wie EAHEC zu identifizieren und die epidemiologische Analyse bei Infektionsausbrüchen zu unterstützen.

6 Zusammenfassung

Aufgrund der Verbreitung von Antibiotikaresistenzen bei pathogenen Mikroorganismen über vertikalen und horizontalen Gentransfer ist die Suche nach neuen Antiinfektiva ein bedeutsames Forschungsfeld. Gegenstand dieser Untersuchung sind Naturstoffe wie Anthocyane aus Beerenextrakten, denen gesundheitsfördernde, antioxidative Eigenschaften zugeschrieben werden, und antimikrobiellen Peptiden (AMP) aus Insekten. Anthocyan-haltige Beerenextrakte und AMP wurden *in vitro* im Mikrotiterplatten-Screening getestet. Das Traubenextrakt *Dakapo* zeigte einen inhibitorischen Effekt auf das Wachstum von *L. monocytogenes*, *Enterococci* und einen wachstumsinduzierenden Effekt auf Vertreter der Familie *Enterobacteriaceae* wie *E. coli*. Die Insekten-AMP wirkten gegenüber Gram-negativen, multiresistenten Bakterien wie *E. coli* und *K. pneumoniae* (insbes. *Stomoxyn* von *Stomoxys calcitrans*), während *Defensin Tca1* aus *Tribolium castaneum* das Wachstum der Gram-positiven Bakterien *L. monocytogenes* und MRSA hemmte. Infektionsversuche mit Larven der Großen Wachsmotte *Galleria mellonella* bestätigten die Wirkungen der Anthocyane bzw. der AMP *in vivo*. Die Injektion von *Dakapo* in Kombination mit *E. coli* und *K. pneumoniae* führte zu einer geringeren Überlebensrate der Larven, da *Dakapo* das Bakterienwachstum förderte. Gegen *L. monocytogenes* und *E. faecalis* hatte das Traubenextrakt einen Schutzeffekt. Die getesteten AMP hatten eine protektive Wirkung gegenüber multiresistenten Bakterien in *G. mellonella*, denn nach Injektion der Pathogene in Kombination mit wirksamen AMP überlebten die Larven, während die nicht AMP-behandelten, infizierten starben. Mittels Transkriptomanalysen wurden Wirkmechanismen aufgeschlüsselt, die den anti- (*L. monocytogenes*) bzw. promikrobiellen (EAHEC) Effekten von *Dakapo* zugrunde liegen. Bei EAHEC zeigte sich eine enorme Regulierung der Eisenhomöostase mit Induktion verschiedener Siderophore, Runterregulierung des Eisendicitrattransportsystems und Eisenspeicherproteinen. In *L. monocytogenes* deutete die Hochregulierung von β -Glukosidasen, des Eisenspeicherproteins Fri und Stressfaktoren auf oxidativen Stress durch die Metabolisierung der Anthocyane hin. *Dakapo* verstärkte die Wirkung von verschiedenen Antibiotika gegen *L. monocytogenes*, was für einen möglichen Therapieeinsatz von Anthocyanen als Adjuvantia in der Humanmedizin oder als Zusatz in Lebensmitteln zur Prävention einer Listeriose spricht. Die Suche nach neuen Antiinfektiva ist komplex, da Substanzen wie das Traubenextrakt *Dakapo*, die auf einige Krankheitserreger hemmend wirken (*L. monocytogenes*), gleichzeitig andere Pathogene durch die antioxidativen Eigenschaften der Anthocyane und Erhöhung der Serumresistenz im Wachstum fördern (EAHEC).

7 Summary

The expansion of antibiotic resistances in pathogenic microorganisms due to vertical and horizontal gene transfers lead to research activities for new anti-infectives. The purpose of this research is to examine natural substances for example secondary plant metabolites such as anthocyanins with health promoting, antioxidative properties and antimicrobial peptides (AMPs) derived from insects. *In vitro*, the anthocyanins-containing berry extracts and AMPs were tested in microtiterplates. The grape extract *Dakapo* has an inhibitory effect on the growth of *L. monocytogenes*, *Enterococci* and a growth inducing effect on representatives of the *Enterobacteriaceae* family such as *E. coli*. The insect AMPs are effective against gram-negative, multiresistant bacteria e.g. *E. coli* and *K. pneumoniae* (especially *Stomoxyn* from *Stomoxys calcitrans*). The *Defensin Tca1* from *Tribolium castaneum* inhibits the growth of the gram-positive bacteria *L. monocytogenes* and MRSA. The effects of anthocyanins and AMPs are confirmed *in vivo* in larvae of the Greater wax moth *Galleria mellonella*. Injection with *Dakapo* in combination with *E. coli* and *K. pneumoniae* reduces the survival rate due to the bacterial growth induced by *Dakapo*. The grape extract has a protecting effect against *L. monocytogenes* and *E. faecalis*. In *G. mellonella* the AMPs have proved to be efficient against multiresistant bacteria. After being injected with pathogens in combination with active AMPs, all larvae survived whereas the larvae not treated with AMP died. Using transcriptomic analysis, information was determined on the mechanisms lying behind the antimicrobial (*L. monocytogenes*) and promicrobial (EAHEC) effects of *Dakapo*. In EAHEC, the iron homeostasis is strongly regulated by the induction of different siderophores and the inhibition of iron(III)dicitrate transport systems and iron storage proteins. In *L. monocytogenes*, anthocyanins cause oxidative stress indicated by the up regulation of β -glucosidases, iron storage protein Fri and stress factors. *Dakapo*-treatment potentiates the effect of different antibiotics against *L. monocytogenes*. Therefore, anthocyanins can be used as adjuvants in human medicine or as food additives for prevention of listeriosis. The search for new anti-infectives is complex and the effects have to be considered in a differentiating manner. Substances such as the grape extract *Dakapo* inhibit the growth of some pathogens (*L. monocytogenes*) but contemporaneously due to antioxidative properties of anthocyanins and increased serum resistance induce growth of other disease causing microorganisms (EAHEC).

8 Abkürzungsverzeichnis

A, Ala	Alanin
ABC	<i>ATP-binding cassette transporter</i> (ATP-bindende Kasette Transporter)
AMP	antimikrobielle/s Peptid/e
APD	<i>The Antimicrobial Peptide Database</i>
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BHI	<i>brain heart infusion</i> (Hirn-Herz-Bouillon)
BK	Blutkultur
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
bp	Basenpaar/e
C, Cys	Cystein
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
cfu	<i>colony forming units</i> (koloniebildende Einheiten, Lebendzellzahl)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Ct	<i>cycle threshold</i>
CTX	Cefotaxim
D, Asp	Asparaginsäure
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamino-2-phenylindol
D-3-G	Delphinidin-3-Glukosid
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>dps</i>	<i>DNA protection during starvation protein</i>
E	Primeramplifikationseffizienz
E, Glu	Glutaminsäure
EAEC	enteroaggregativen <i>Escherichia coli</i>
EAHEC	enteroaggregativer-hämorrhagischer <i>Escherichia coli</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDCC	<i>Eugen Domann Culture Collection</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i> (Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit)
EHEC	enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
ESBL	Extended-Spektrum-β-Laktamasen
et al.	et alii (und andere)
F, Ph	Phenylalanin
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i> (Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fe	Eisen
FL	Fließgewässer
g	Gramm
G, Gly	Glycin
GIM	<i>Grace's insect medium</i>
GIT	Gastrointestinaltrakt
<i>G. mellonella</i>	<i>Galleria mellonella</i> (Große Wachsmotte)
H	Wasserstoff
H, His	Histidin
H ₂ O	Wasser

H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HPF	Hydroxyphenylfluorescein
HUS	Hämolytisch-urämisches Syndrom
HWI	Harnwegsinfektionen
I, Ile	Isoleucin
K.	<i>Klebsiella</i>
K, Lys	Lysin
kbp	Kilo-Basenpaare (1000 Basenpaare)
KBE	koloniebildende Einheiten
K _f	Komplexbildungskoeffizient
KL HUS	Konsiliarlabor für hämolytisch-urämisches Syndrom
l	Liter
L, Leu	Leucin
LB	<i>lysogeny broth</i>
LLO	Listeriolysin O
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
LOEWE	Landesoffensive zur Entwicklung wissenschaftlich-ökonomischer Exzellenz
LW	Leitungswasser
M	Molar
M, Met	Methionin
M-3-G	Malvidin-3-Glukosid
MHK	minimale Hemmkonzentration/en
mRNA	<i>messenger</i> RNA (Boten-RNA)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
mg	Milligramm
Min.	Minute/n
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MM	Minimalmedium
MRE	multiresistente Erreger
MRGN	multiresistente, Gram-negative Stäbchen
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MW	Molekulargewicht
n	<i>number</i> (Anzahl)
N, Asp	Asparagin
NaCl	Natriumchlorid
NAD ⁺ /NADH	oxidierte/reduzierte Form von Nicotinamidadenindinukleotid
NGS	<i>Next generation sequencing</i>
nm	Nanometer
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ^{•-}	Superoxidanion
OD	optische Dichte
OH [•]	Hydroxylradikal
OW	Oberflächengewässer
P, Pro	Prolin
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i> (Pathogen-assoziierte molekulare Muster)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (<i>Polymerase-chain-reaction</i>)
PEP-PTS	Phosphoenolpyruvat-Phosphotransferasesystem
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese

PGM TM	Personal Genome Machine TM
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PI	Patientenisolat
PTS	Phosphotransferase-System
Q, Glu	Glutamin
qRT-PCR	quantitative Real-Time-PCR
R, Arg	Arginin
rcf	<i>relative centrifugal force</i> (relative Zentripetalbeschleunigung)
RIN	<i>RNA integrity number</i> (RNA-Integritätsnummer)
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
RPKM	<i>reads per kilobase of exon model per million mapped reads</i>
rpm	<i>rotations per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
S1, S2, S3, S4	biologische Schutzstufe gemäß Biostoffverordnung (BiostoffV) und Gentechnikgesetz (GenTG)
S.	<i>Staphylococcus</i>
S, Ser	Serin
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumlaurylsulfat)
spp.	<i>species pluralis</i>
ssDNA	<i>single-stranded DNA</i>
Std.	Stunde/n
STX	Shiga-Toxin
T, Thr	Threonin
TBE	Puffer aus Tris-Borat-EDTA
<i>T. castaneum</i>	<i>Tribolium castaneum</i> (rotbrauner Reismehlkäfer)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i> (Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon)
u	<i>units</i> (Einheiten)
ÜNK	Übernachtskultur/en
V, Val	Valin
VBNC	<i>viable-but-not-culturable</i> (lebensfähig, aber nicht kultivierbar)
VRE	Vancomycin-resistente/ <i>r Enterococcus</i> /Enterokokken
W, Trp	Tryptophan
Wt	Wildtyp
Y, Tyr	Tyrosin

9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der Invasion und des intrazellulären Lebenszyklus von <i>L. monocytogenes</i>	4
Abb. 2: Ursprung des neuartigen <i>E. coli</i> -Pathotyps EAHEC	5
Abb. 3: Fenton-Reaktion durch Recycling von Fe^{3+} zu Fe^{2+} durch zelluläre Reduktionsmittel (NADH)	7
Abb. 4: Modell für die Wirkmechanismen bakterizider Antibiotika	8
Abb. 5: Siderophore-abhängige Eisenaufnahmesysteme in <i>E. coli</i>	10
Abb. 6: Anthocyanidin-Grundgerüst; Substitutionsmuster; Malvidin-3-O-Glukosid; Eisenkomplexbildung	15
Abb. 7: Mechanismus für die Cyanidin-DNA-Interaktion	17
Abb. 8: Modelle der Porenbildung und Zerstörung der Lipiddoppelschicht durch AMP	21
Abb. 9: Das Immunsystem von <i>G. mellonella</i>	24
Abb. 10: Die Große Wachsmotte <i>G. mellonella</i>	36
Abb. 11: <i>In vitro</i> -Effekt von <i>Dakapo</i> auf EAHEC und <i>L. monocytogenes</i>	51
Abb. 12: Dosis-Wirkungs-Effekt von <i>Dakapo</i> auf das Wachstum von verschiedenen Bakterien	52
Abb. 13: Ermittlung der KBE von EAHEC und <i>L. monocytogenes</i> nach Inkubation mit <i>Dakapo</i>	53
Abb. 14: Wachstum von EAHEC nach Zugabe von <i>Apidaecin Ia</i>	54
Abb. 15: Effizienz von <i>Defensin Tca1</i> gegenüber <i>L. monocytogenes</i> ΔoppA und Wt	56
Abb. 16: Dosis-Wirkungs-Effekte von AMP auf <i>E. coli</i> (ESBL)	57
Abb. 17: Dosis-Wirkungs-Effekte von AMP auf <i>K. pneumoniae</i> (ESBL)	58
Abb. 18: Dosis-Wirkungs-Effekte von <i>Defensin Tca1</i> von <i>T. castaneum</i> auf MRSA und <i>L. monocytogenes</i> (Wt)	58
Abb. 19: Dosis-Wirkungs-Effekte nach Infektion von <i>G. mellonella</i> mit <i>L. monocytogenes</i> (Wt)	59
Abb. 20: Dosis-Wirkungs-Effekte nach Infektion von <i>G. mellonella</i> mit <i>E. coli</i> Stämmen; Schutzeffekt durch Meropenem gegenüber EAHEC	60
Abb. 21: <i>In vivo</i> -Wachstumsinduktion pathogener Bakterien durch <i>Dakapo</i>	61
Abb. 22: <i>In vivo</i> -Schutzeffekt gegenüber pathogenen Bakterien durch <i>Dakapo</i>	61
Abb. 23: <i>In vivo</i> -Schutzeffekt verschiedener AMP gegenüber <i>E. coli</i> (ESBL)	62
Abb. 24: Schutzeffekt von <i>Pyrrhocoricin</i> in <i>G. mellonella</i> gegenüber einer Infektion mit <i>E. coli</i> (ESBL)	62
Abb. 25: <i>In vivo</i> -Schutzeffekt verschiedener AMP gegenüber <i>K. pneumoniae</i> (ESBL)	63
Abb. 26: <i>In vivo</i> -Schutzeffekt von <i>Defensin Tca1</i> gegenüber Gram-positiven Bakterien	63
Abb. 27: <i>L. monocytogenes</i> (Wt) nach Kultivierung mit <i>Dakapo</i> , drei Stunden 30 Minuten, 37 °C	64
Abb. 28: Änderung der Genexpression in <i>L. monocytogenes</i> (Wt) durch <i>Dakapo</i>	65
Abb. 29: Kategorisierung der durch <i>Dakapo</i> (77 μM) induzierten Gene in <i>L. monocytogenes</i> (Wt)	65
Abb. 30: Kategorisierung der durch <i>Dakapo</i> (77 μM) inhibierten Gene in <i>L. monocytogenes</i> (Wt)	66
Abb. 31: Induktion von verschiedenen Glukosidasen durch <i>Dakapo</i> in <i>L. monocytogenes</i>	67
Abb. 32: EAHEC nach Kultivierung mit <i>Dakapo</i> , drei Stunden, 37 °C	70
Abb. 33: Änderung der Genexpression in EAHEC durch <i>Dakapo</i>	71

Abb. 34: Kategorisierung der durch <i>Dakapo</i> (77 μ M) induzierten Gene in EAHEC	71
Abb. 35: Kategorisierung der durch <i>Dakapo</i> (77 μ M) inhibierten Gene in EAHEC	72
Abb. 36: Anteil der durch <i>Dakapo</i> regulierten, am Eisenmetabolismus beteiligten Gene	73
Abb. 37: Gencluster für Siderophore in EAHEC	75
Abb. 38: qRT-PCR mit ausgewählten Genen von <i>L. monocytogenes</i> (Wt)	76
Abb. 39: qRT-PCR mit ausgewählten Genen von EAHEC	76
Abb. 40: Aktivität der β -Glukosidasen in <i>L. monocytogenes</i> (Wt) nach Inkubation mit <i>Dakapo</i> ..	77
Abb. 41: Abschwächung des inhibitorischen Effektes von <i>Dakapo</i> bei anaerobem Wachstum ..	78
Abb. 42: Effekt von <i>Dakapo</i> auf das Wachstum von <i>L. monocytogenes</i> (Wt) im MM mit verschiedenen Kohlenhydratquellen	79
Abb. 43: Effekt von <i>Dakapo</i> auf das Wachstum der Δpdh -Deletionsmutante	80
Abb. 44: Effekt von <i>Dakapo</i> auf das Wachstum der $\Delta sodA$ -Deletionsmutante	80
Abb. 45: Induktion von DNA-Schäden in <i>L. monocytogenes</i> (Wt) durch <i>Dakapo</i> (PFGE)	81
Abb. 46: Effekt von D-3-G und M-3-G auf das Wachstum von <i>L. monocytogenes</i> (Wt) und $\Delta sodA$ -Mutante	82
Abb. 47: Effekt von D-3-G und M-3-G auf Deletionsmutanten von <i>L. monocytogenes</i>	82
Abb. 48: Effekt von Fe-III-Citrat und <i>Dakapo</i> auf das Wachstum von <i>L. monocytogenes</i> (Wt) ..	83
Abb. 49: Effekte von Fe-III-Citrat und isolierter Anthocyane auf das Wachstum von <i>L. monocytogenes</i>	84
Abb. 50: Wirkung von <i>Dakapo</i> auf die Suszeptibilität gegenüber Penicillin	85
Abb. 51: Wirkung von Catechol auf die Suszeptibilität gegenüber Penicillin	85
Abb. 52: Effekt des kationischen Peptides LL-37 mit <i>Dakapo</i>	86
Abb. 53: Abfangen von oxidativem Stress durch <i>Dakapo</i> in <i>E. coli</i>	87
Abb. 54: Untersuchung von oxidativem Stress mittels HPF	87
Abb. 55: Antioxidativer Effekt von <i>Dakapo</i> in <i>E. coli</i> (PFGE)	88
Abb. 56: Effekt von D-3-G und M-3-G auf das Wachstum von EAHEC	89
Abb. 57: Effekte einer Eisensupplementierung und <i>Dakapo</i> auf das Wachstum von <i>E. coli</i>	89
Abb. 58: Erhöhung der Serumresistenz durch <i>Dakapo</i> bei EAHEC	90
Abb. 59: Einfluss von <i>Dakapo</i> und Serum auf die <i>fur</i> -Mutante von <i>E. coli</i> K12	90
Abb. 60: Überleben von <i>E. coli</i> K12 und EAHEC in verschiedenen Gewässern	91
Abb. 61: Überleben von <i>E. coli</i> K12 und EAHEC in FL, LW, OW und Vergleich 4 °C mit 20 °C ..	92
Abb. 62: <i>Live-Dead-Staining</i> von Bakterien	92
Abb. 63: Effekt von <i>Dakapo</i> auf den VBNC-Zustand von <i>E. coli</i> in verschiedenen Gewässern ..	93
Abb. 64: Untersuchung der Resistenzstabilität von EAHEC in FL	94
Abb. 65: Hämozyten isoliert aus <i>G. mellonella</i>	94
Abb. 66: Infizierte Hämozyten (Fluoreszenzmikroskopie)	95
Abb. 67: Infizierte Hämozyten mit EAHEC (Konfokalmikroskopie)	96
Abb. 68: Korrekte Disulfidbrückenverknüpfung in <i>Defensin Tca1</i> (<i>T. castaneum</i>)	102
Abb. 69: Darstellung der divergierenden Aspekte des antibiotischen ROS-Paradigmas	111
Abb. 70: Abbau von Catechol zu Acetyl-CoA	115

10 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Taxonomie der Kultur-Weinrebe	13
Tab. 2: Taxonomie von <i>Galleria mellonella</i>	22
Tab. 3: Übersicht Bakterienstämme, Angaben zur Herkunft, pathogenem Potential und Kultivierung	26
Tab. 4: Anthocyangehalt der Beerenextrakte <i>Dakapo</i> , <i>Accent</i> , Heidelbeere und Holunderbeer-Liquid (g/100 g).....	27
Tab. 5: Insektenpeptide	28
Tab. 6: Einfacher Ansatz für die cDNA-Synthese	40
Tab. 7: Mastermix, einfacher Ansatz für die qRT-PCR	41
Tab. 8: Verwendete Primer für die qRT-PCR.....	42
Tab. 9: Einteilung der Determinanten zum Vergleich des Bakterienwachstums	48
Tab. 10: Bakterienwachstum verschiedener Spezies nach Inkubation mit Anthocyan-haltigen Substanzen.....	51
Tab. 11: Bakterienwachstum verschiedener Spezies nach Inkubation mit AMP von Insekten ..	55
Tab. 12: Suppression von Transportmechanismen in <i>L. monocytogenes</i> (Wt) durch <i>Dakapo</i> ...	69
Tab. 13: Integration der Effekte durch <i>Dakapo</i> in <i>L. monocytogenes</i> und EAHEC	117

11 Literaturverzeichnis

- 1) Adams TJ, Vartivarian S, Cowart RE (1990): Iron acquisition systems of *Listeria monocytogenes*. Infect. Immun. Aug;58(8):2715-8.
- 2) Ali Ahmed MY (2012): Characterization and molecular epidemiology of ESBL-producing *E. coli* derived from university hospitals of Egypt and Germany. Ph.D.thesis.
- 3) Altincicek B, Knorr E, Vilcinskis A (2008): Beetle immunity: Identification of immune-inducible genes from the model insect *Tribolium castaneum*. Dev. Comp. Immunol.;32(5):585-95.
- 4) Andersen OM (Editor), Markham KR (Editor) (2006): Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Raton, FL. London. New York.
- 5) Arumugam M et al. (2011): Enterotypes of the human gut microbiome. Nat. May 12;473(7346):174-80.
- 6) Aurass P, Prager R, Flieger A (2011): EHEC/EAEC O104:H4 strain linked with the 2011 German outbreak of haemolytic uremic syndrome enters into the viable but non-culturable state in response to various stresses and resuscitates upon stress relief. Environ. Microbiol. Dec;13(12):3139-48.
- 7) Avdeef A, Sofen SR, Bregante TL, Raymond KN (1978): Coordination chemistry of microbial iron transport compounds. 9. Stability constants for catechol models of Enterobactin. J. Am. Chem. Soc. 100 (17)/August 16. pp 5362–5370.
- 8) Bayer E (1966): Complex Formation and Flower Color: Angew. Chem. internat. Edit. Vol.5. No.9.
- 9) Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2012): Biochemistry. Seventh Edition. palgrave macmillan. W.H. Freeman and Company. New York.
- 10) Bielaszewska M, Mellmann A, Zhang W, Köck R, Fruth A, Bauwens A, Peters G, Karch H (2011): Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. Lancet Infect. Dis. Sep;11(9):671-6.
- 11) Blaut M, Clavel T (2007): Metabolic diversity of the intestinal microbiota: implications for health and disease. J. Nutr. Mar;137(3 Suppl 2):751S-5S.
- 12) Borezee E, Pellegrini E, Berche P (2000): OppA of *Listeria monocytogenes*, an oligopeptide-binding protein required for bacterial growth at low temperature and involved in intracellular survival. Infect. Immun. Dec;68(12):7069-77.
- 13) Boulou L, Prévost M, Barbeau B, Coallier J, Desjardins R: LIVE/DEAD BacLight (1999): application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. J. Microbiol. Methods. Jul;37(1):77-86.
- 14) Bresinsky A, Körner C, Kadereit JW, Neuhaus G, Sonnewald U (2008): Strasburger Lehrbuch der Botanik. 36. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg.
- 15) Brzuszkiewicz E, Thürmer A, Schuldes J, Leimbach A, Liesegang H, Meyer FD, Boelter J, Petersen H, Gottschalk G, Daniel R (2011): Genome sequence analyses of two isolates from the recent *Escherichia coli* outbreak in Germany reveal the emergence of a new pathotype: Enterotoxigenic-Escherichia coli (EAHEC). Arch. Microbiol. Dec;193(12):883-91.

-
- ¹⁶⁾ Buchweitz M, Carle R, Kammerer DR (2012): Bathochromic and stabilising effects of sugar beet pectin and an isolated pectic fraction on anthocyanins exhibiting pyrogallol and catechol moieties. *Food Chem.* Dec 15;135(4):3010-9.
- ¹⁷⁾ Bulet P, Stöcklin R (2005): Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. *Protein Pept Lett.* Jan;12(1):3-11. *Immunol. Rev.* Apr;198:169-84.
- ¹⁸⁾ Bulet P, Stöcklin R, Menin L (2004): Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev.* Apr;198:169-84.
- ¹⁹⁾ Bulet P, Urge L, Ohresser S, Hetru C, Otvos L Jr (1996): Enlarged scale chemical synthesis and range of activity of *drosocin*, an O-glycosylated antibacterial peptide of *Drosophila*. *Eur. J. Biochem.* May 15;238(1):64-9.
- ²⁰⁾ Bundesministerium für Gesundheit (2013): Resistenzen gegen Antibiotika gemeinsam bekämpfen - Deutsche Antibiotika-Resistenzstrategie (DART) grundlegend überarbeitet. In: <http://www.bmg.bund.de/ministerium/presse/pressemitteilungen/2013-04/dart-grundlegend-ueberarbeitet.html> (22.01.14)
- ²¹⁾ Bundesministerium für Gesundheit (2013): Die E-Nummern der Zusatzstoffe. In: http://bmg.gv.at/home/Schwerpunkte/VerbraucherInnenengesundheit/Lebensmittel/Aromen_Enzyme_Zusatzstoffe/ (05.11.13)
- ²²⁾ Caspi R et al. (2012): The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases. *Nucleic Acids Res.* Jan;40(Database issue):D742-53.
- ²³⁾ Cesoniene L, Jasutiene I, Sarkinas A (2009): Phenolics and anthocyanins in berries of European cranberry and their antimicrobial activity. *Medicina (Kaunas).* 45(12):992-9.
- ²⁴⁾ Che Omar SN, Ong Abdullah J, Khairoji KA, Chin Chin S, Hamid M (2013): Effects of flower and fruit extracts of *Melastoma malabathricum* Linn. on growth of pathogenic bacteria: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Salmonella typhimurium*. *Evid. Based Complement Alternat. Med.*;2013:459089.
- ²⁵⁾ Cheung MK, Li L, Nong W, Kwan HS (2011): 2011 German *Escherichia coli* O104:H4 outbreak: whole-genome phylogeny without alignment. *BMC Res. Notes.* Dec 13;4(1):533
- ²⁶⁾ Chiancone E, Ceci P, Ilari A, Ribacchi F, Stefanini S (2004): Iron and proteins for iron storage and detoxification. *Biometals.* Jun;17(3):197-202.
- ²⁷⁾ Clements A, Young JC, Constantinou N, Frankel G (2012): Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes.* Mar-Apr;3(2):71-87.
- ²⁸⁾ Cooke D, Steward WP, Gescher AJ, Marczylo T (2005): Anthocyanins from fruits and vegetables--does bright colour signal cancer chemopreventive activity? *Eur. J. Cancer.* Sep;41(13):1931-40.
- ²⁹⁾ Coulanges V, Andre P, Vidon DJ (1998): Effect of siderophores, catecholamines, and catechol compounds on *Listeria* spp. Growth in iron-complexed medium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Aug 19;249(2):526-30.
- ³⁰⁾ Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN (2009): Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat. Prod. Rep.* Aug;26(8):1001-43.
- ³¹⁾ Darbouche A, Zechel S, Chakraborty T, Domann E (2012): Identification of a beta-glucosidase in *Listeria monocytogenes* EGD and characterization of its gene product. *Journal Academica.* Vol. 2(2), pp. 77-98, June 29.

-
- ³²⁾ Darbouche (1996): Genetische und biochemische Untersuchung einer β -Glucosidase und Herstellung von Deletionsmutanten in *Listeria monocytogenes*. Diplomarbeit.
- ³³⁾ Day AJ, DuPont MS, Ridley S, Rhodes M, Rhodes MJ, Morgan MR, Williamson G (1998): Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. *FEBS Lett.* Sep 25;436(1):71-5.
- ³⁴⁾ De Gregorio E, Spellman PT, Rubin GM, Lemaitre B (2001): Genome-wide analysis of the *Drosophila* immune response by using oligonucleotide microarrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Oct 23;98(22):12590-5.
- ³⁵⁾ den Bakker HC, Cummings CA, Ferreira V, Vatta P, Orsi RH, Degoricija L, Barker M, Petrauskene O, Furtado MR, Wiedmann M (2010): Comparative genomics of the bacterial genus *Listeria*: Genome evolution is characterized by limited gene acquisition and limited gene loss. *BMC Genomics.* Dec 2;11:688.
- ³⁶⁾ Desbois AP, Coote PJ (2012): Utility of Greater Wax Moth Larva (*Galleria mellonella*) for Evaluating the Toxicity and Efficacy of New Antimicrobial Agents. *Adv. Appl. Microbiol.* 78:25-53.
- ³⁷⁾ Dethlefsen L, McFall-Ngai M, Relman DA (2007): An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nat.* Oct 18;449(7164):811-8.
- ³⁸⁾ DGE [Hrsg.] (2013): D-A-CH-Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr. 2. Auflage, Umschau-Verlag. Frankfurt am Main.
- ³⁹⁾ Dietrich H., Fröhling B., Hofmann, D., Rühl E. H., Will F (2009): Herstellung von Roten Traubensäften u. Anthocyanextrakten aus dem Trester anthocyanreicher Traubensorten, Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 105, 695-702. Behr's Verlag. Hamburg.
- ⁴⁰⁾ Dussurget O, Pizarro-Cerda J, Cossart P (2004): Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. *Annu. Rev. Microbiol.*;58:587-610.
- ⁴¹⁾ Dwyer DJ, Kohanski MA, Collins JJ (2009). Role of reactive oxygen species in antibiotic action and resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* Oct;12(5):482-9.
- ⁴²⁾ European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2010): Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2010. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net).
- ⁴³⁾ European Food Saety Authority (EFSA) (2013): Scientific Opinion on the re-evaluation of anthocyanins (E 163) as a food additive. EFSA Panel on food additives and nutrient sources added to food (ANS). *EFSA Journal* 2013;11(4):3145 [51 pp.].
- ⁴⁴⁾ European Food Saety Authority (EFSA) Joint EFSA/ECDC technical report (2011): Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* in humans, food and animals in the EU/EEA, with special reference to the German outbreak strain STEC O104. Issued: 8 Juni.
- ⁴⁵⁾ Fang FC (2013): Antibiotic and ROS linkage questioned. *Nat Biotechnol.* May;31(5):415-6.
- ⁴⁶⁾ Fauvarque MO, Williams MJ (2011): *Drosophila* cellular immunity: a story of migration and adhesion. *J Cell Sci.* May 1;124(Pt 9):1373-82.
- ⁴⁷⁾ Fedhila S, Buisson C, Dussurget O, Serror P, Glomski IJ, Liehl P, Lereclus D, Nielsen-LeRoux C (2010): Comparative analysis of the virulence of invertebrate and mammalian pathogenic bacteria in the oral insect infection model *Galleria mellonella*. *J Invertebr Pathol.* Jan;103(1):24-9.
- ⁴⁸⁾ Fenton HJH (1894): Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J. Chem. Soc. Trans.* 65, 899-910.

-
- 49) Fischer M [Hrsg.] (2014): Neue und alte Infektionskrankheiten. Springer-Verlag GmbH. Heidelberg.
- 50) Fleschhut J (2004): Untersuchungen zum Metabolismus, zur Bioverfügbarkeit und zur antioxidativen Wirkung von Anthocyanen. Dissertation. Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der Universität Karlsruhe (TH).
- 51) Food and Drug Administration (2013): GRAS Substances (SCOGS) Database. Alphabetical List of SCOGS Substances. In: <http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/SCOGS/ucm084104.htm> (06.01.14)
- 52) Foulquié Moreno MR, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, De Vuyst L (2006): The role and application of *enterococci* in food and health. Int. J. Food Microbiol. Jan 15;106(1):1-24.
- 53) Frank C et al. (2011): Large and ongoing outbreak of haemolytic uraemic syndrome, Germany, May 2011. Euro. Surveill. May 26;16(21).
- 54) Freitas AR, Novais C, Tedim AP, Francia MV, Baquero F, Peixe L, Coque TM (2013): Microevolutionary events involving narrow host plasmids influences local fixation of vancomycin-resistance in *Enterococcus* populations. PLoS One. 8(3):e60589.
- 55) Gandhe AS, John SH, Nagaraju J (2007): Noduler, a novel immune up-regulated protein mediates nodulation response in insects. J. Immunol. Nov 15;179(10):6943-51.
- 56) García-Lara J, Needham AJ, Foster SJ (2005). Invertebrates as animal models for *Staphylococcus aureus* pathogenesis: a window into host-pathogen interaction. FEMS Immunol. Med. Microbiol. Mar 1;43(3):311-23.
- 57) Garénaux A, Caza M, Dozois CM (2011): The Ins and Outs of siderophore mediated iron uptake by extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*. Vet. Microbiol. Nov 21;153(1-2):89-98.
- 58) GECO. In: <http://bioinfo.mikro.bio.med.uni-Gießen.de/geco2internal/GecoServlet> (04.06.13).
- 59) George F, Figueiredo P, Brouillard R (1999): Malvin Z-chalcone: An unexpected new open cavity for the ferric cation. Phytochemistry. Volume 50, Issue 8, 1 April, Pages 1391–1394.
- 60) Glaser P et al. (2001): Comparative genomics of *Listeria* species. Science. Oct 26;294(5543):849-52.
- 61) Gobbo M, Biondi L, Filira F, Gennaro R, Benincasa M, Scolaro B, Rocchi R (2002): Antimicrobial peptides: synthesis and antibacterial activity of linear and cyclic *drosocin* and *apidaecin 1b* analogues. J. Med. Chem. Sep 26;45(20):4494-504.
- 62) Goldsmith MR, Marec F (2010): Molecular Biology and Genetics of the Lepidoptera, CRC Press, Taylor and Francis Group LLC. USA.
- 63) Graves LM et al. (2010): *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. Jun;60(Pt 6):1280-8.
- 64) Groß, Uwe (2009): Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, 2. Auflage, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart.
- 65) Guarner F, Malagelada JR (2003): Gut flora in health and disease. Lancet. Feb 8;361(9356):512-9.
- 66) Hadi SM, Bhat SH, Azmi AS, Hanif S, Shamim U, Ullah MF (2007): Oxidative breakage of cellular DNA by plant polyphenols: a putative mechanism for anticancer properties. Semin. Cancer Biol. Oct;17(5):370-6.

-
- ⁶⁷⁾ Haeupler H, Muer T (2007): Bildatlas der Farn- und Blütenpflanzen Deutschlands. 2., korr. und erw. Aufl. Ulmer. Stuttgart.
- ⁶⁸⁾ Hain T et al. (2012): Comparative genomics and transcriptomics of lineages I, II, and III strains of *Listeria monocytogenes*. BMC Genomics. Apr 24;13:144.
- ⁶⁹⁾ Hain T et al. (2006): Whole-genome sequence of *Listeria welshimeri* reveals common steps in genome reduction with *Listeria innocua* as compared to *Listeria monocytogenes*. J. Bacteriol. Nov;188(21):7405-15.
- ⁷⁰⁾ Hauser E et al. (2013): Phylogenetic and molecular analysis of food-borne shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. Apr;79(8):2731-40.
- ⁷¹⁾ He J, Giusti MM (2010): Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. Annu. Rev. Food Sci. Technol. 1:163-87.
- ⁷²⁾ Hider RC, Kong X (2010): Chemistry and biology of siderophores. Nat. Prod. Rep. May;27(5):637-57.
- ⁷³⁾ Hoffmann JA, Hetru C (1992): Insect defensins: inducible antibacterial peptides. Immunol. Today. Oct;13(10):411-5.
- ⁷⁴⁾ Hofmann D (2012): Verbesserung der Anthocyanstabilität in flüssigen und pastösen Fruchtprodukten am Beispiel von Brombeeren (*Rubus*), Erdbeeren (*Fragaria*), Sauerkirschen (*Prunus cerasus*) und roten Trauben (*Vitis vinifera*). Dissertation. Cuvillier Verlag. Göttingen.
- ⁷⁵⁾ Imlay JA, Linn S (1986): Bimodal pattern of killing of DNA-repair-defective or anoxically grown *Escherichia coli* by hydrogen peroxide. J. Bacteriol. May;166(2):519-27.
- ⁷⁶⁾ Invitrogen GmbH (2004): LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit for microscopy and quantitative assays. Product Information. Darmstadt.
- ⁷⁷⁾ Jean-Gilles D, Li L, Ma H, Yuan T, Chichester CO, Seeram NP (2011): Anti-inflammatory Effects of Polyphenolic-Enriched Red Raspberry Extract in an Antigen-Induced Arthritis Rat Model. J. Agric. Food Chem. Dec 1.
- ⁷⁸⁾ Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS (1994): Virulence of enterococci. Clin. Microbiol. Rev. Oct;7(4):462-78.
- ⁷⁹⁾ Jiang H, Vilcinskis A, Kanost MR (2010): Immunity in lepidopteran insects. Adv. Exp. Med. Biol. 708:181-204.
- ⁸⁰⁾ Johansson J, Mandin P, Renzoni A, Chiaruttini C, Springer M, Cossart P (2002): An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. Cell. Sep 6;110(5):551-61.
- ⁸¹⁾ Kajfasz JK, Mendoza JE, Gaca AO, Miller JH, Koselny KA, Giambiagi-Demarval M, Wellington M, Abranches J, Lemos JA (2012): The Spx regulator modulates stress responses and virulence in *Enterococcus faecalis*. Infect. Immun. Jul;80(7):2265-75.
- ⁸²⁾ Kanehisa M, Goto S (2000): KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. Nucleic Acids Res. Jan 1;28(1):27-30.
- ⁸³⁾ Kao SM, Hassan HM (1985): Biochemical characterization of a paraquat-tolerant mutant of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. Sep 5;260(19):10478-81.
- ⁸⁴⁾ Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL (2004): Pathogenic *Escherichia coli*. Nat. Rev. Microbiol. Feb;2(2):123-40.

-
- ⁸⁵⁾ Kaume L, Howard LR, Devareddy L (2011): The Blackberry Fruit: A Review on Its Composition and Chemistry, Metabolism and Bioavailability, and Health Benefits. J. Agric. Food Chem. Dec 8.
- ⁸⁶⁾ Kayser FH, Böttger EC, Zinkernagel RM, Haller O, Eckert J, Deplazes P (2010): Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie. Thieme. Stuttgart.
- ⁸⁷⁾ Kelsey N, Hulick W, Winter A, Ross E, Linseman D (2011): Neuroprotective effects of anthocyanins on apoptosis induced by mitochondrial oxidative stress. Nutr. Neurosci. Nov;14(6):249-59.
- ⁸⁸⁾ Keren I, Wu Y, Inocencio J, Mulcahy LR, Lewis K (2013): Killing by bactericidal antibiotics does not depend on reactive oxygen species. Science. Mar 8;339(6124):1213-6.
- ⁸⁹⁾ Keseler IM et al. (2011): EcoCyc: a comprehensive database of *Escherichia coli* biology. Nucleic Acids Res. 39:D583-590.
- ⁹⁰⁾ Kim JY, Hong JH, Jung HK, Jeong YS, Cho KH (2012): Grape skin and loquat leaf extracts and acai puree have potent anti-atherosclerotic and anti-diabetic activity in vitro and in vivo in hypercholesterolemic zebrafish. Int. J. Mol. Med. Sep;30(3):606-14.
- ⁹¹⁾ KL HUS (Konsiliarlabor für Hämolytisch–Urämisches Syndrom), Universitätsklinikum Münster. In: <http://www.ehec.org/index.php?lang=de&pid=Homepage> (11.11.13)
- ⁹²⁾ KL HUS (Konsiliarlabor für Hämolytisch–Urämisches Syndrom), Universitätsklinikum Münster (2011): Laborinformationen zum EHEC Ausbruchsstamm (Stand 1. Juni 2011). In: http://www.ehec.org/pdf/Laborinfo_01062011.pdf (11.11.13)
- ⁹³⁾ Kohanski MA, DePristo MA, Collins JJ (2010a): Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. Mol. Cell. Feb 12;37(3):311-20.
- ⁹⁴⁾ Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ (2010b): How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. Nat. Rev. Microbiol. Jun;8(6):423-35.
- ⁹⁵⁾ Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, Lawrence CA, Collins JJ (2007): A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. Cell. Sep 7;130(5):797-810.
- ⁹⁶⁾ Kong JM, Chia LS, Goh NK, Chia TF, Brouillard R (2003): Analysis and biological activities of anthocyanins. Phytochemistry. Nov;64(5):923-33.
- ⁹⁷⁾ Kragol G, Hoffmann R, Chattergoon MA, Lovas S, Cudic M, Bulet P, Condie BA, Rosengren KJ, Montaner LJ, Otvos L Jr (2002): Identification of crucial residues for the antibacterial activity of the proline-rich peptide, pyrrhocoricin. Eur. J. Biochem. Sep;269(17):4226-37.
- ⁹⁸⁾ Kragol G, Lovas S, Varadi G, Condie BA, Hoffmann R, Otvos L Jr (2001): The antibacterial peptide pyrrhocoricin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding. Biochemistry. 2001 Mar 13;40(10):3016-26.
- ⁹⁹⁾ Krawitz C, Mraheil MA, Stein M, Imirzalioglu C, Domann E, Pleschka S, Hain T (2011): Inhibitory activity of a standardized elderberry liquid extract against clinically-relevant human respiratory bacterial pathogens and influenza A and B viruses. BMC Complement Altern Med. Feb 25;11:16.
- ¹⁰⁰⁾ Kristensen NP, Skalski AW (1998): Phylogeny and palaeontology. In: Lepidoptera, moths and butterflies.1.Evolution, systematic, and biogeography, ed. N.P. Kristensen, 7-25. Handbook of Zoologie, Vol. 4, Part 35, Arthropoda: Insecta. Walter de Gruyter. Berlin and New York.
- ¹⁰¹⁾ Kuenne CT, Ghai R, Chakraborty T, Hain T (2007): GECO--linear visualization for comparative genomics. Bioinformatics. Jan 1;23(1):125-6.

-
- ¹⁰²⁾ Kumarasamy KK et al. (2010): Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect. Dis.* Sep;10(9):597-602.
- ¹⁰³⁾ Künne C, Billion A, Mshana SE, Schmiedel J, Domann E, Hossain H, Hain T, Imirzalioglu C, Chakraborty T (2012): Complete sequences of plasmids from the hemolytic-uremic syndrome-associated *Escherichia coli* strain EAHEC41. *J. Bacteriol.* Jan;194(2):532-3.
- ¹⁰⁴⁾ Lacombe A, McGivney C, Tadepalli S, Sun X, Wu VC (2013): The effect of American cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) constituents on the growth inhibition, membrane integrity, and injury of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in comparison to *Lactobacillus rhamnosus*. *Food Microbiol.* Jun;34(2):352-9.
- ¹⁰⁵⁾ Lacombe A, Wu VC, White J, Tadepalli S, Andre EE (2012): The antimicrobial properties of the lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium*) fractional components against foodborne pathogens and the conservation of probiotic *Lactobacillus rhamnosus*. *Food Microbiol.* May;30(1):124-31.
- ¹⁰⁶⁾ Lane N (2011): The Evolution of Oxidative Stress. In: Pantopoulos K, Schipper HM: Principles of Free Radical Biomedicine. Volume 1. Nova Science Publishers. Inc.
- ¹⁰⁷⁾ Lapidot T, Harel S, Akiri B, Granit R, Kanner J (1999): PH-dependent forms of red wine anthocyanins as antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* Jan;47(1):67-70.
- ¹⁰⁸⁾ Leclercq A et al. (2010): *Listeria rocourtiae* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* Sep;60(Pt 9):2210-4.
- ¹⁰⁹⁾ Lee HH, Collins JJ (2011): Microbial environments confound antibiotic efficacy. *Nat. Chem. Biol.* Dec 15;8(1):6-9.
- ¹¹⁰⁾ Leelakriangsak M, Huyen NT, Töwe S, van Duy N, Becher D, Hecker M, Antelmann H, Zuber P (2008): Regulation of quinone detoxification by the thiol stress sensing DUF24/MarR-like repressor, YodB in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* Mar;67(5):1108-24.
- ¹¹¹⁾ Liebeke M, Pöther DC, van Duy N, Albrecht D, Becher D, Hochgräfe F, Lalk M, Hecker M, Antelmann H (2008): Depletion of thiol-containing proteins in response to quinones in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* Sep;69(6):1513-29.
- ¹¹²⁾ Lieberei R, Reisdorff C, Franke W [Begr.] (2007): Nutzpflanzenkunde. 7., vollst. überarb. und erw. Aufl., Thieme. Stuttgart.
- ¹¹³⁾ Liu Y, Imlay JA (2013): Cell death from antibiotics without the involvement of reactive oxygen species. *Science.* Mar 8;339(6124):1210-3.
- ¹¹⁴⁾ Livermore DM et al. (2007): CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J. Antimicrob. Chemother.* Feb;59(2):165-74.
- ¹¹⁵⁾ Löffler G (2008): Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie.7., komplett überarb. Aufl.: Springer-Medizin-Verl. Heidelberg.
- ¹¹⁶⁾ Lyte M (2010): The microbial organ in the gut as a driver of homeostasis and disease. *Med. Hypotheses.* Apr;74(4):634-8.
- ¹¹⁷⁾ Madigan MT, Martinko JM (2009): Brock Mikrobiologie. 11., aktualisierte Auflage. Pearson Studium. München. Boston. San Francisco. Harlow, England. Don Mills, Ontario. Sydney. Mexiko City. Madrid. Amsterdam.
- ¹¹⁸⁾ Mahren S, Schnell H, Braun V (2005): Occurrence and regulation of the ferric citrate transport system in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, and *Photobacterium luminescens*. *Arch. Microbiol.* Nov;184(3):175-86.

-
- ¹¹⁹⁾ Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C (2005): Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.* Jan;81(1 Suppl):230S-242S.
- ¹²⁰⁾ Manzanares P, Rojas V, Genovés S, Vallés S (2000): A preliminary search for anthocyanin- β -D-glucosidase activity in non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Int. J. Food Sci. Technol.* 35, 95-103.
- ¹²¹⁾ Mas T, Susperregui J, Berké B, Chèze C, Moreau S, Nuhric A, Vercauteren J (2000): DNA triplex stabilization property of natural anthocyanins. *Phytochemistry*. Mar;53(6):679-87.
- ¹²²⁾ Mayer CL, Leibowitz CS, Kurosawa S, Stearns-Kurosawa DJ (2012): Shiga toxins and the pathophysiology of hemolytic uremic syndrome in humans and animals. *Toxins (Basel)*. Nov 8;4(11):1261-87.
- ¹²³⁾ McDougall GJ, Fyffe S, Dobson P, Stewart D (2007): Anthocyanins from red cabbage--stability to simulated gastrointestinal digestion. *Phytochemistry*. May;68(9):1285-94.
- ¹²⁴⁾ McGhie TK, Walton MC (2007): The bioavailability and absorption of anthocyanins: towards a better understanding. *Mol. Nutr. Food Res.* Jun;51(6):702-13.
- ¹²⁵⁾ Mead GP, Ratcliffe NA, Renwrentz LR (1985): The separation of insect haemocyte types on percoll gradients; methodology and problems. *J. Insect Physiol.* Vol. 32, No. 2, pp. 167-177.
- ¹²⁶⁾ Mellmann A et al. (2011): Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. *PLoS One*. ;6(7):e22751.
- ¹²⁷⁾ Mellmann A, Bielaszewska M, Köck R, Friedrich AW, Fruth A, Middendorf B, Harmsen D, Schmidt MA, Karch H (2008): Analysis of collection of hemolytic uremic syndrome-associated enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.* Aug;14(8):1287-90.
- ¹²⁸⁾ Miethke M, Marahiel MA (2007): Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* Sep;71(3):413-51.
- ¹²⁹⁾ Monnet V (2003): Bacterial oligopeptide-binding proteins. *Cell Mol. Life Sci.* Oct;60(10):2100-14.
- ¹³⁰⁾ Morell M, Czihal P, Hoffmann R, Otvos L, Avilés FX, Ventura S (2008): Monitoring the interference of protein-protein interactions in vivo by bimolecular fluorescence complementation: the DnaK case. *Proteomics*. Sep;8(17):3433-42.
- ¹³¹⁾ Mraheil MA et al. (2011): The intracellular sRNA transcriptome of *Listeria monocytogenes* during growth in macrophages. *Nucleic Acids Res.* May;39(10):4235-48.
- ¹³²⁾ Mshana SE, Imirzalioglu C, Hossain H, Hain T, Domann E, Chakraborty T (2009): Conjugative IncFI plasmids carrying CTX-M-15 among *Escherichia coli* ESBL producing isolates at a University hospital in Germany. *BMC Infect. Dis.* Jun 17;9:97.
- ¹³³⁾ Muniesa M, Hammerl JA, Hertwig S, Appel B, Brüssow H (2012): Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4: a new challenge for microbiology. *Appl. Environ. Microbiol.* Jun;78(12):4065-73.
- ¹³⁴⁾ Murrar BE (1998): Diversity among the multidrug-resistant *enterococci*. *Emerg. Infect. Dis.* May Vol. 4, No. 1. p. 46-65.
- ¹³⁵⁾ Murray EGD, Webb RE, Swann MBR (1926): A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis caused by a hitherto undescribed *bacillus Bacterium monocytogenes* (n.sp.). *J. Pathol. Bacteriol.* 29:407-439.

-
- ¹³⁶⁾ Naseer U, Sundsfjord A (2011): The CTX-M conundrum: dissemination of plasmids and *Escherichia coli* clones. *Microb. Drug Resist.* Mar;17(1):83-97.
- ¹³⁷⁾ Neveu V et al. (2010): Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database* (Oxford).
- ¹³⁸⁾ Newton SM, Vy Trinh, Hualiang Pi, Phillip E. Klebba (2010): Direct Measurements of the Outer Membrane Stage of Ferric Enterobactin Transport: Postuptake binding. *J. Biol. Chem.* June 4; 285(23): 17488–17497.
- ¹³⁹⁾ Nilsson RE, Ross T, Bowman JP, Britz ML (2013): MudPIT Profiling Reveals a Link between Anaerobic Metabolism and the Alkaline Adaptive Response of *Listeria monocytogenes* EGD-e. *PLoS One.* 2013;8(1):e54157.
- ¹⁴⁰⁾ Nuss M, Speidel W, Segerer A (2012): Fauna Europaea, *Pyrallidae*. In: Karsholt Ole, van Nieukerken EJ (2012) Fauna Europaea, *Lepidoptera*, Moths. Fauna Europaea version 2.6.2. In: <http://www.faunaeur.org> (14.11.13).
- ¹⁴¹⁾ Nuss M et al. (2003–2011): Global Information System on *Pyraloidea*. In: www.pyraloidea.org (13.11.13).
- ¹⁴²⁾ Ogier JC, Serror P (2008): Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* Sep 1;126(3):291-301.
- ¹⁴³⁾ Oliver JD (2005): The viable but nonculturable state in bacteria. *J. Microbiol.* Feb;43 Spec No:93-100.
- ¹⁴⁴⁾ Otto M (2013): Community-associated MRSA: what makes them special? *Int. J. Med. Microbiol.* Aug;303(6-7):324-30.
- ¹⁴⁵⁾ Otto M (2010): *Staphylococcus aureus* toxin gene hitchhikes on a transferable antibiotic resistance element. *Virulence.* Jan-Feb;1(1):49-51.
- ¹⁴⁶⁾ Paulsen IT et al. (2003): Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science.* Mar 28;299(5615):2071-4.
- ¹⁴⁷⁾ Perron NR, Brumaghim JL (2009): A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem. Biophys.* 53(2):75-100.
- ¹⁴⁸⁾ Pfaffl MW (2004): Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum, Sonderausgabe PCR*, 10, S. 92-95.
- ¹⁴⁹⁾ Pfaffl MW (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* May 1;29(9):e45.
- ¹⁵⁰⁾ Premaratne RJ, Lin WJ, Johnson EA (1991): Development of an improved chemically defined minimal medium for *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* Oct;57(10):3046-8.
- ¹⁵¹⁾ ProtParam ExPASy Bioinformatics Resource Portal. In: <http://web.expasy.org/protparam/> (07.11.13)
- ¹⁵²⁾ Puupponen-Pimiä R, Nohynek L, Hartmann-Schmidlin S, Kähkönen M, Heinonen M, Määtä-Riihinen K, Oksman-Caldentey KM (2005): Berry phenolics selectively inhibit the growth of intestinal pathogens. *J. Appl. Microbiol.*;98(4):991-1000.
- ¹⁵³⁾ Rasko DA et al. (2011): Origins of the *E. coli* strain causing an outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany. *N. Engl. J. Med.* Aug 25;365(8):709-17.

-
- ¹⁵⁴⁾ Rathnayake IU, Hargreaves M, Huygens F (2012): Antibiotic resistance and virulence traits in clinical and environmental *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates. Syst. Appl. Microbiol. Jul;35(5):326-33.
- ¹⁵⁵⁾ Reiersen B, Kiremire BT, Byamukama R, Andersen M ØM (2003): Anthocyanin sacylated with gallic acid from chenille plant, Acalyphahispida. Phytochemistry. Oct;64(4):867-71.
- ¹⁵⁶⁾ Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996): Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radic. Biol. Med. 20(7):933-56.
- ¹⁵⁷⁾ RKI (2013). In:
http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/NRZ/Konsiliar/Listerien/konsiliar_listerien_node.html
(11.11.13).
- ¹⁵⁸⁾ RKI (2012): Hygienemaßnahmen bei Infektionen oder Besiedlung mit multiresistenten gramnegativen Stäbchen. Bundesgesundheitsbl 55:1311-1354. ©Springer-Verlag.
- ¹⁵⁹⁾ RKI (2011): Abschlussbericht zum EHEC/HUS-Ausbruch. Abschließende Darstellung und Bewertung der epidemiologischen Erkenntnisse im EHEC O104:H4 Ausbruch Deutschland 2011. Erscheinungsdatum 9. September. Berlin.
- ¹⁶⁰⁾ RKI (2011): Ausbruchs-Falldefinition für EHEC- und HUS-Fälle im Rahmen des Ausbruchs im Frühjahr 2011 in Deutschland. In:
http://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/E/EHEC/EHEC_O104/Falldefinition_EHEC_O104.pdf?_blob=publicationFile (11.11.13).
- ¹⁶¹⁾ RKI (2011): Stellungnahme Nr. 031/2011 des BfR vom 26. Juli 2011 zur Bedeutung von EHEC O104:H4 in Bockshornkleesamen. In:
http://www.bfr.bund.de/cm/343/bedeutung_von_ehec_o104_h4_in_bockshornkleesamen_die_zu_anderen_lebensmitteln_als_sprossen_und_keimlingen_weiterverarbeitet_werden.pdf
(06.11.13)
- ¹⁶²⁾ Rochat T, Nicolas P, Delumeau O, Rabatinová A, Korelusová J, Leduc A, Bessières P, Dervyn E, Krásny L, Noirot P (2012): Genome-wide identification of genes directly regulated by the pleiotropic transcription factor Spx in *Bacillus subtilis*. Nucleic Acids Res. Oct;40(19):9571-83.
- ¹⁶³⁾ Sagdic O, Ekici L, Ozturk I, Tekinay T, Polat B, Tastemur B, Bayram O, Senturk B (2013): Cytotoxic and bioactive properties of different color tulip flowers and degradation kinetic of tulip flower anthocyanins. Food Chem. Toxicol. Aug;58:432-9.
- ¹⁶⁴⁾ Sahm DF, Kissinger J, Gilmore MS, Murray PR, Mulder R, Solliday J, Clarke B (1989): In vitro susceptibility studies of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. Antimicrob. Agents Chemother. Sep;33(9):1588-91.
- ¹⁶⁵⁾ Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L (2005): Dietary polyphenols and the prevention of diseases. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 45(4):287-306.
- ¹⁶⁶⁾ Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T (2006): The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. BMC Mol. Biol. Jan 31;7:3.
- ¹⁶⁷⁾ Scully LR, Bidochka MJ (2005): Serial passage of the opportunistic pathogen *Aspergillus flavus* through an insect host yields decreased saprobic capacity. Can. J. Microbiol. Feb;51(2):185-9.
- ¹⁶⁸⁾ Seeram NP, Bourquin LD, Nair MG (2001): Degradation products of cyanidin glycosides from tart cherries and their bioactivities. J. Agric. Food Chem. Oct;49(10):4924-9.

-
- ¹⁶⁹⁾ Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB (2010): Gut microbiota in health and disease. *Physiol. Rev.* Jul;90(3):859-904.
- ¹⁷⁰⁾ Siebold C, Flükiger K, Beutler R, Erni B (2001): Carbohydrate transporters of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system (PTS). *FEBS Lett.* Aug 31;504(3):104-11.
- ¹⁷¹⁾ Sies H (1985): Oxidative stress: introductory remarks. In: Sies H (Ed.), *Oxidative Stress*. London: Academic Press. pp. 1–8.
- ¹⁷²⁾ Simon N, Coulanges V, Andre P, Vidon DJ (1995): Utilization of exogenous siderophores and natural catechols by *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* Apr;61(4):1643-5.
- ¹⁷³⁾ Skaar EP (2010): The battle for iron between bacterial pathogens and their vertebrate hosts. *PLoS Pathog.* Aug 12;6(8):e1000949.
- ¹⁷⁴⁾ Song BJ, Sapper TN, Burtch CE, Brimmer K, Goldschmidt M, Ferruzzi MG (2013): Photo- and thermodegradation of anthocyanins from grape and purple sweet potato in model beverage systems. *J. Agric. Food Chem.* Feb 13;61(6):1364-72.
- ¹⁷⁵⁾ Stavru F, Archambaud C, Cossart P (2011): Cell biology and immunology of *Listeria monocytogenes* infections: novel insights. *Immunol. Rev.* Mar;240(1):160-84.
- ¹⁷⁶⁾ Stille W, Brodt HR, Groll AH, Just-Nübling G (2005): *Antibiotika-Theapie. Klinik und Praxis der antiinfektiösen Behandlung*. 11. Auflage, Schattauer, Stuttgart, New-York.
- ¹⁷⁷⁾ Stoll R, Goebel W (2010): The major PEP-phosphotransferase systems (PTSs) for glucose, mannose and cellobiose of *Listeria monocytogenes*, and their significance for extra- and intracellular growth. *Microbiology.* Apr;156(Pt 4):1069-83
- ¹⁷⁸⁾ Szklarczyk D et al. (2011): The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored. *Nucleic Acids Res.* Jan;39(Database issue):D561-8.
- ¹⁷⁹⁾ Tahara S (2007): A journey of twenty-five years through the ecological biochemistry of flavonoids. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* Jun;71(6):1387-404.
- ¹⁸⁰⁾ Tecan Group Ltd. (2008): Instructions for Use for infinite® 200. Männedorf, Schweiz.
- ¹⁸¹⁾ Tseng A, Zhao Y (2012): Effect of different drying methods and storage time on the retention of bioactive compounds and antibacterial activity of wine grape pomace (Pinot Noir and Merlot). *J. Food Sci.* Sep;77(9):H192-201.
- ¹⁸²⁾ Tsuda T (2008): Regulation of adipocyte function by anthocyanins; possibility of preventing the metabolic syndrome. *J. Agric. Food Chem.* Feb 13;56(3):642-6.
- ¹⁸³⁾ Turner J, Cho Y, Dinh NN, Waring AJ, Lehrer RI (1998): Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils. *Antimicrob. Agents Chemother.* Sep;42(9):2206-14.
- ¹⁸⁴⁾ Tzouvelekis LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL (2012): Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions. *Clin. Microbiol. Rev.* Oct;25(4):682-707.
- ¹⁸⁵⁾ UniProt Consortium (2013): Update on activities at the Universal Protein Resource (UniProt) in 2013. *Nucleic Acids Res.* Jan;41(Database issue):D43-7.
- ¹⁸⁶⁾ Vaillancourt FH, Bolin JT, Eltis LD (2006): The ins and outs of ring-cleaving dioxygenases. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* Jul-Aug;41(4):241-67.

-
- ¹⁸⁷⁾ van Acker SA, van den Berg DJ, Tromp MN, Griffioen DH, van Bennekom WP, van der Vijgh WJ, Bast A (1996): Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.* 20(3):331-42.
- ¹⁸⁸⁾ van Meurs ML, Schellekens JJ, de Neeling AJ, Duim B, Schneeberger PM, Hermans MH (2013): Real-time PCR to distinguish livestock-associated (ST398) from non-livestock-associated (methicillin-resistant) *Staphylococcus aureus*. *Infection.* Apr;41(2):339-46.
- ¹⁸⁹⁾ Vasconcelos JA, Deneer HG (1994): Expression of superoxide dismutase in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* Jul;60(7):2360-6.
- ¹⁹⁰⁾ Vázquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Domínguez-Bernal G, Goebel W, González-Zorn B, Wehland J, Kreft J (2001): *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin. Microbiol. Rev.* Jul;14(3):584-640.
- ¹⁹¹⁾ Vilcinskis A (2011): *Insect biotechnology*. Springer Dordrecht. Heidelberg. London. New York.
- ¹⁹²⁾ Vrieze A, Holleman F, Zoetendal EG, de Vos WM, Hoekstra JB, Nieuwdorp M (2010): The environment within: how gut microbiota may influence metabolism and body composition. *Diabetologia.* Apr;53(4):606-13.
- ¹⁹³⁾ Wang G, Li X, Wang Z (2009): APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Res.* Jan;37(Database issue):D933-7.
- ¹⁹⁴⁾ Watzl B, Leitzmann C (2005): *Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln*. 3., unveränderte Auflage. Hippokrates Verlag in MVS Medizinverlage. Stuttgart.
- ¹⁹⁵⁾ Watzl B, Briviba K, Rechkemmer G (2002): Anthocyane. *Basiswissen aktualisiert. Ernährungs-Umschau* 49. Heft 4.
- ¹⁹⁶⁾ Wollheim C, Guerra IM, Conte VD, Hoffman SP, Schreiner FJ, Delamare AP, Barth AL, Echeverrigaray S, Costa SO (2011): Nosocomial and community infections due to class A extended-spectrum β -lactamase (ESBLA)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in southern Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.* Apr;15(2):138-43.
- ¹⁹⁷⁾ Wu X, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Prior RL (2006): Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *J. Agric. Food Chem.* May 31;54(11):4069-75.
- ¹⁹⁸⁾ Yoshida K, Kitahara S, Ito D, Kondo T (2006): Ferric ions involved in the flower color development of the Himalayan blue poppy, *Meconopsis grandis*. *Phytochemistry.* May;67(10):992-8.
- ¹⁹⁹⁾ Zanetti M (2005): The role of cathelicidins in the innate host defenses of mammals. *Curr. Issues Mol. Biol.* Jul;7(2):179-96.
- ²⁰⁰⁾ Zhang Y, Vareed SK, Nair MG (2005): Human tumor cell growth inhibition by nontoxic anthocyanidins, the pigments in fruits and vegetables. *Life Sci.* Feb 11;76(13):1465-72.
- ²⁰¹⁾ Zhu X, Zhao X, Burkholder WF, Gragerov A, Ogata CM, Gottesman ME, Hendrickson WA (1996): Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science.* Jun 14;272(5268):1606-14.
- ²⁰²⁾ Zuber P (2013): *Function and Control of the Spx-Family of Proteins Within the Bacterial Stress Response*. SpringerBriefs in Microbiology. pp. 1-35.
- ²⁰³⁾ Zuber P (2004): Spx-RNA polymerase interaction and global transcriptional control during oxidative stress. *J. Bacteriol.* Apr;186(7):1911-8.

12 Glossar

In der naturwissenschaftlichen Forschung sind viele Bezeichnungen von der Englischsprachigen Literatur geprägt, für die es keine adäquaten deutschen Begriffe gibt. Im Folgenden werden für diese Arbeit relevante Fachtermini beschrieben:

Fold change: In einem Zwei-Gruppen-Experiment gibt der *fold change* an, um wie viel größer oder kleiner die Expressionsrate eines Gens zwischen diesen Gruppen ist. Im vorliegenden Fall werden die RPKM (*reads per kilobase of exon model per million mapped reads*) der mit dem Traubenextrakt *Dakapo* behandelten Gruppe durch die RPKM der unbehandelten Gruppe dividiert. Wenn der Wert der behandelten Gruppe größer ist, als der der unbehandelten Gruppe, liegt eine Induktion der Genexpression vor (positiver *fold change*). Ist der Wert der Behandlungsgruppe kleiner als der der unbehandelten Gruppe, handelt es sich um eine inhibierte Genexpression (negativer *fold change*).

Mapping: *Reads* werden auf der Basis von Sequenzhomologie den passenden Stellen des Ursprungsgenoms zugeordnet. Im Rahmen einer RNA-Sequenzierung bedeutet dies, dass die sequenzierten RNA-Fragmente den Genen zugeordnet werden, von denen sie transkribiert wurden.

Next generation sequencing (NGS): Der Begriff bezeichnet moderne, beschleunigte Sequenzierungs-Verfahren, die chronologisch nach der traditionellen Kettenabbruch-Methode von Frederick Sanger, entwickelt wurden. NGS ermöglicht die parallele Sequenzierung von Millionen DNA-Fragmenten in einem einzigen Sequenzierdurchlauf, wobei sehr viele *reads* bei vergleichsweise geringerem Aufwand ermittelt werden können. Im Gegensatz zur Sanger-Methode ermitteln NGS-Methoden die jeweilige Base im Moment ihres Einbaus, sozusagen in Echtzeit. Dabei werden verschiedene Methoden unterschieden: Bei der Pyrosequenzierung mit dem 454-Sequencer der Firma Roche, werden modifizierte Nukleotide zur Synthese des komplementären Strangs verwendet, die nach Einbau zur Generation eines Lichtsignals führen. Bei dem in der vorliegenden Dissertation eingesetzten System von Ion Torrent™ wird die Veränderung des pH-Wertes beim Einbau der Basen über einen Ionensensor detektiert und diese chemische in die digitale Information der Sequenz transformiert.

Plug: Blöckchen bei der Pulsfeld-Gelelektrophorese. Die Bakterien werden angezüchtet, mit Agarose verfestigt und in spezielle Kunststoffschienen (Disposable Plug Molds for the preparation of DNA-imbedded agarose plugs, Bio-Rad Laboratoires) gegossen. Mit diesen *Plugs* wird das Gel beladen.

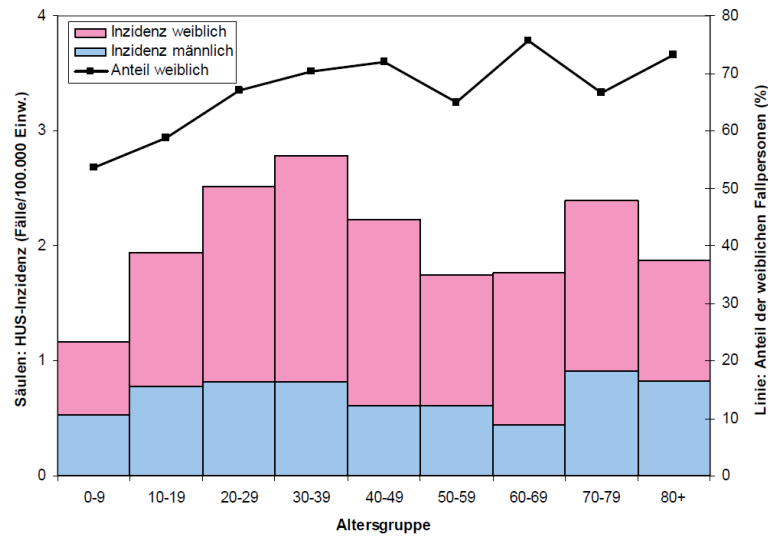
Read: Kurze Sequenz von DNA-Basen, die von einem Gerät bei der Sequenzierung ermittelt wird.

Vortexen: Schütteln von Proben mithilfe des Gerätes Vortex-Genie® 2 der Firma Carl Roth GmbH + Co. KG. Lösungen in Reaktionsgefäßen können mithilfe dieses vibrierenden Gerätes gründlich durchmischt werden, indem das Reaktionsgefäß auf den Schüttelaufsatz, eine Gummimulde, gedrückt wird.

Well: Vertiefung einer Mikrotiterplatte.

13 Anhang

A1: Inzidenz von HUS nach Altersgruppe und Geschlecht (n=855 HUS-Fälle) (RKI, 2011)



A2: Anthocyangehalte der Beerenextrakte (g/100 g)

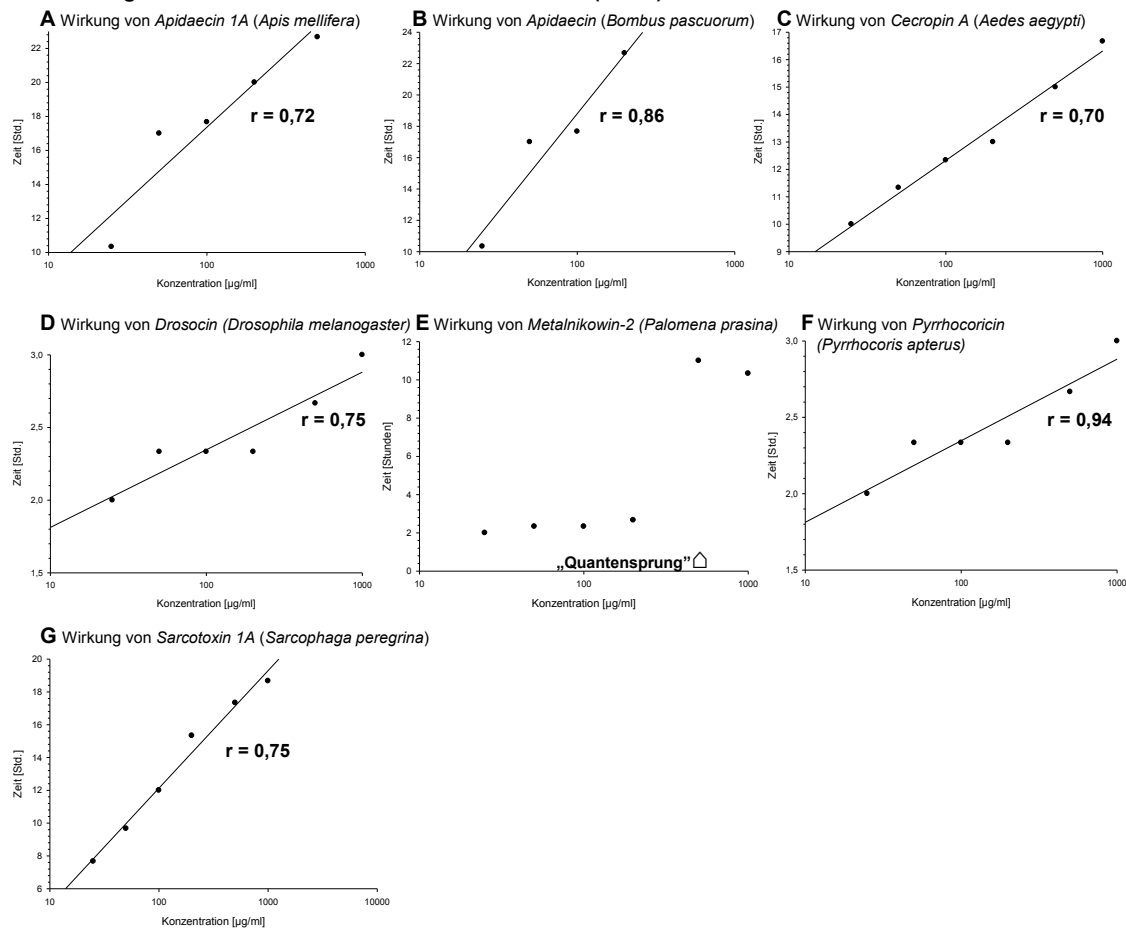
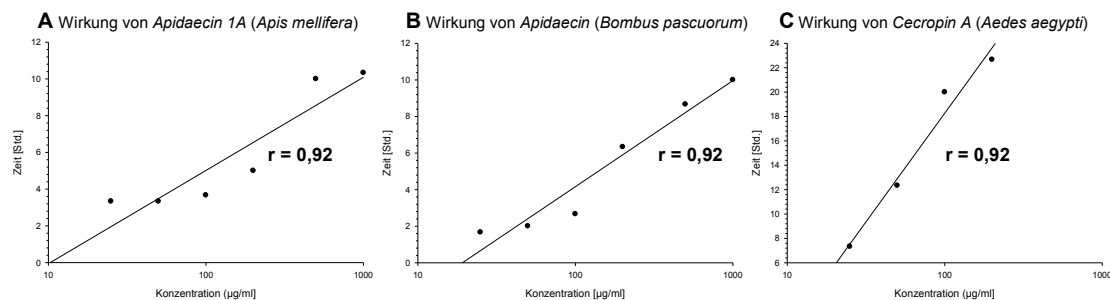
Anthocyanin	Accent	Dakapo	Heidelbeere	Holunder
Cyanidine				
Cyanidin-3-arabinosid	n.b.	n.b.	2,7	n.b.
Cyanidin-3-galaktosid	n.b.	n.b.	2,0	n.b.
Cyanidin-3-glukosid	n.b.	0,5	3,2	2,9
Cyanidin-3,5-diglukosid	0,56	n.b.	n.b.	0,02
Cyanidin-3-(6"-O-acetyl)glukosid	0,27	n.b.	n.b.	n.b.
Cyanidin-3-rutinosid	n.b.	n.b.	n.b.	0,11
Cyanidin-3-sambubiosid	n.b.	n.b.	n.b.	3,1
Cyanidin-3-sambubiosid-5-glukosid	n.b.	n.b.	n.b.	1,1
Delphinidine				
Delphinidin-3-arabinosid	n.b.	n.b.	1,7	n.b.
Delphinidin-3-galaktosid	n.b.	n.b.	1,7	n.b.
Delphinidin-3-glukosid	2,75	2,1	1,9	n.b.
Delphinidin-3,5-diglukosid	0,78	n.b.	n.b.	n.b.
Delphinidin-3-(6"-O-acetyl)glukosid	0,55	0,5	n.b.	n.b.
Malvidine				
Malvidin-3-arabinosid	n.b.	n.b.	0,1	n.b.
Malvidin-3-galaktosid	n.b.	n.b.	0,9	n.b.
Malvidin-3-glukosid	3,1	10,0	2,2	n.b.
Malvidin-3,5-diglukosid	5,21	n.b.	n.b.	n.b.
Malvidin-3-(p-coumaroyl)-5-diglukosid	0,5	n.b.	n.b.	n.b.
Malvidin-3-(6"-O-acetyl)glukosid	0,65	0,3	n.b.	n.b.
Pelargonidine				
Pelargonidin-3-glukosid	n.d.	n.b.	n.b.	0,13
Pelargonidin-3-sambubiosid	n.d.	n.b.	n.b.	0,11
Peonidin				
Peonidin-3-galaktosid	n.b.	n.b.	0,4	n.b.
Peonidin-3-glukosid	2,13	3,5	1,5	n.b.
Peonidin-3,5-diglukosid	2,77	n.b.	n.b.	n.b.
Peonidin-3-(6"-O-acetyl)glukosid	n.b.	2,2	n.b.	n.b.
Petunidine				
Petunidin-3-glukosid	2,19	2,3	1,7	n.b.
Petunidin-3,5-diglukosid	1,4	n.b.	n.b.	n.b.
Petunidin-3-(6"-O-acetyl)glukosid	0,66	0,5	n.b.	n.b.
Petunidin-3-rutinosid	n.b.	1,1	n.b.	n.b.
unbekannte Anthocyane	0,76	n.b.	n.b.	n.b.
Gesamtgehalt Anthocyane	24,3	23,0	20,0	7,47
Zucker				
Glukose	n.b.	n.b.	n.b.	2,09
Fruktose	n.b.	n.b.	n.b.	1,94

n.b. = nicht bekannt

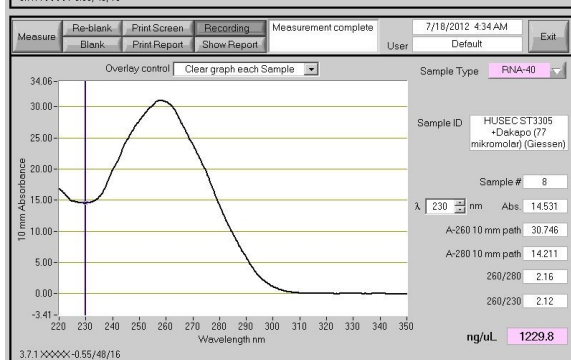
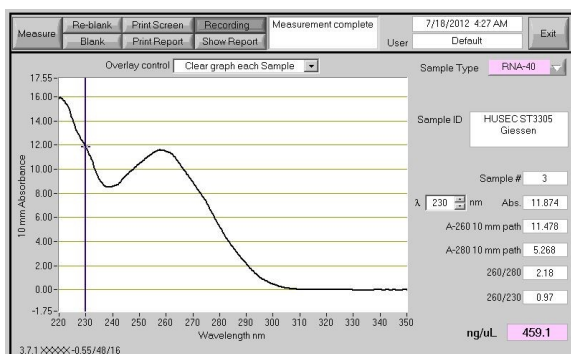
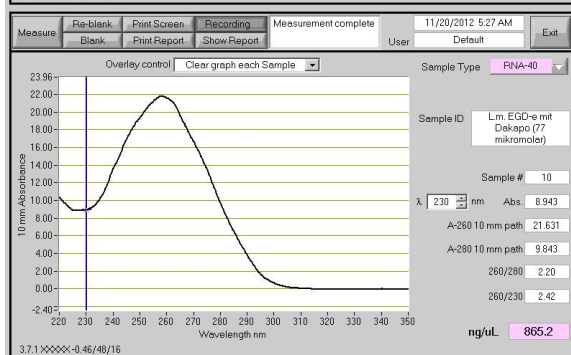
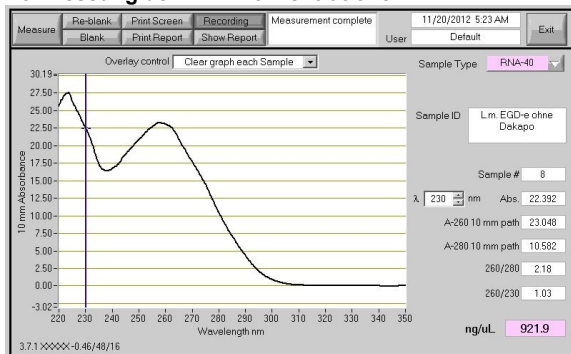
A3: Technische Daten zum Transkriptomexperiment

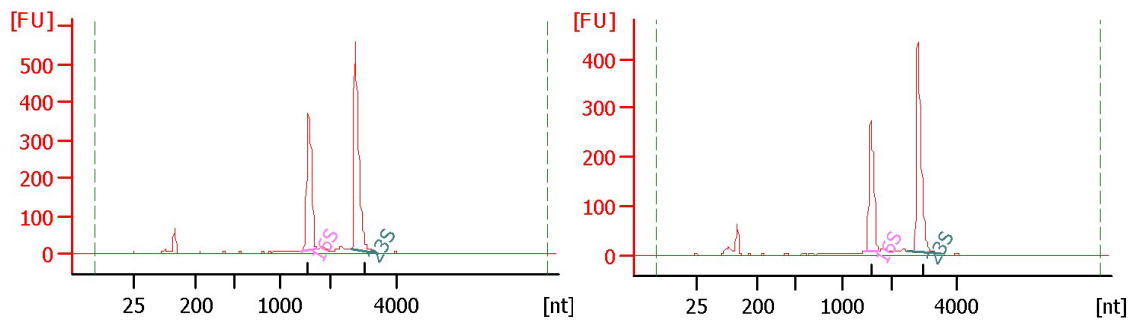
	<i>L. monocytogenes</i> EGD-e ohne <i>Dakapo</i>	<i>L. monocytogenes</i> EGD-e mit <i>Dakapo</i>	EAHEC ohne <i>Dakapo</i>	EAHEC mit <i>Dakapo</i>
Library Summary				
Total Number of Bases [Mbp]	375,97	329,51	333,62	496,66
Number of Q20 Bases* [Mbp]	310,76	233,77	282,12	388,22
Total number of Reads	3.009.279	2.997.018	3.424.303	3.521.371
Mean length [bp]	124	110	97	141
Mapping statistics				
Total fragments	2.972.875	2.997.018	3.424.303	3.521.371
Counted fragments	2.092.772	2.271.992	676.680	2.476.666

*Q20 Bases = Qualitätswert für die Korrektheit einer Base. Entspricht maximal einem Fehler bei 100 Basen.

A4: Wirkung verschiedener AMP auf *E. coli* CTX-M-15414 (ESBL)**A5: Wirkung verschiedener AMP auf *K. pneumoniae* MS39 (ESBL)**

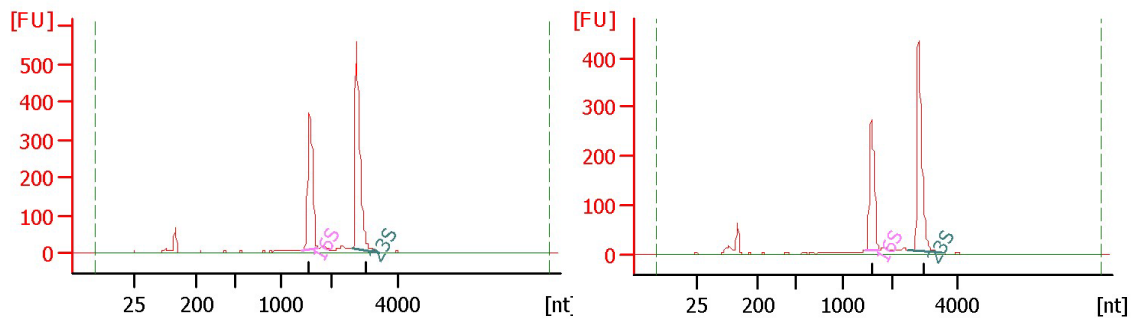
A6: Messung der RNA-Konzentrationen



A7: Bestimmung der RNA-Qualität durch Angabe der RNA integrity number (RIN)

L. monocytogenes EGD-e ohne *Dakapo*; RIN: 10,0

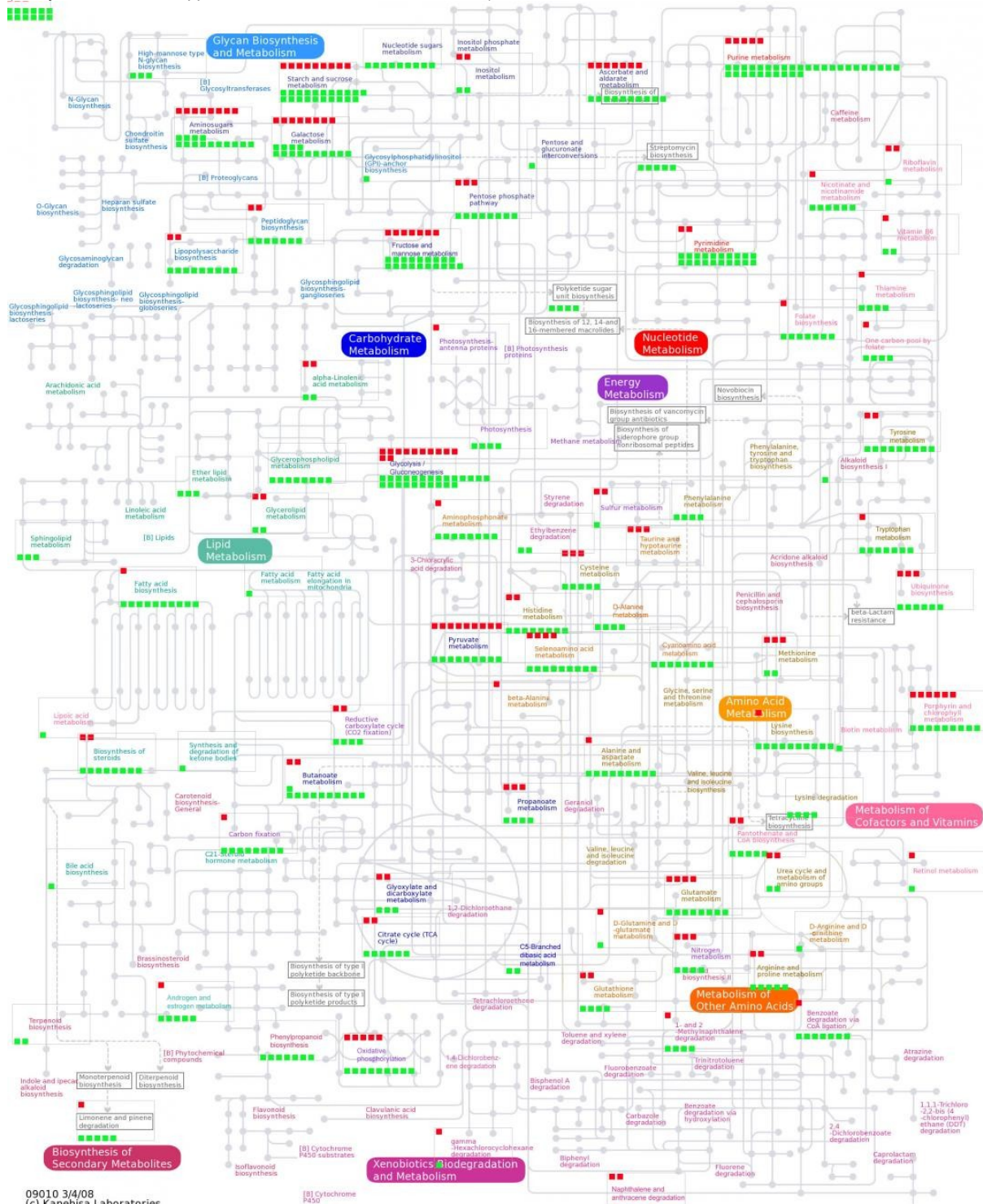
L. monocytogenes EGD-e mit *Dakapo* (77 µM); RIN: 10,0



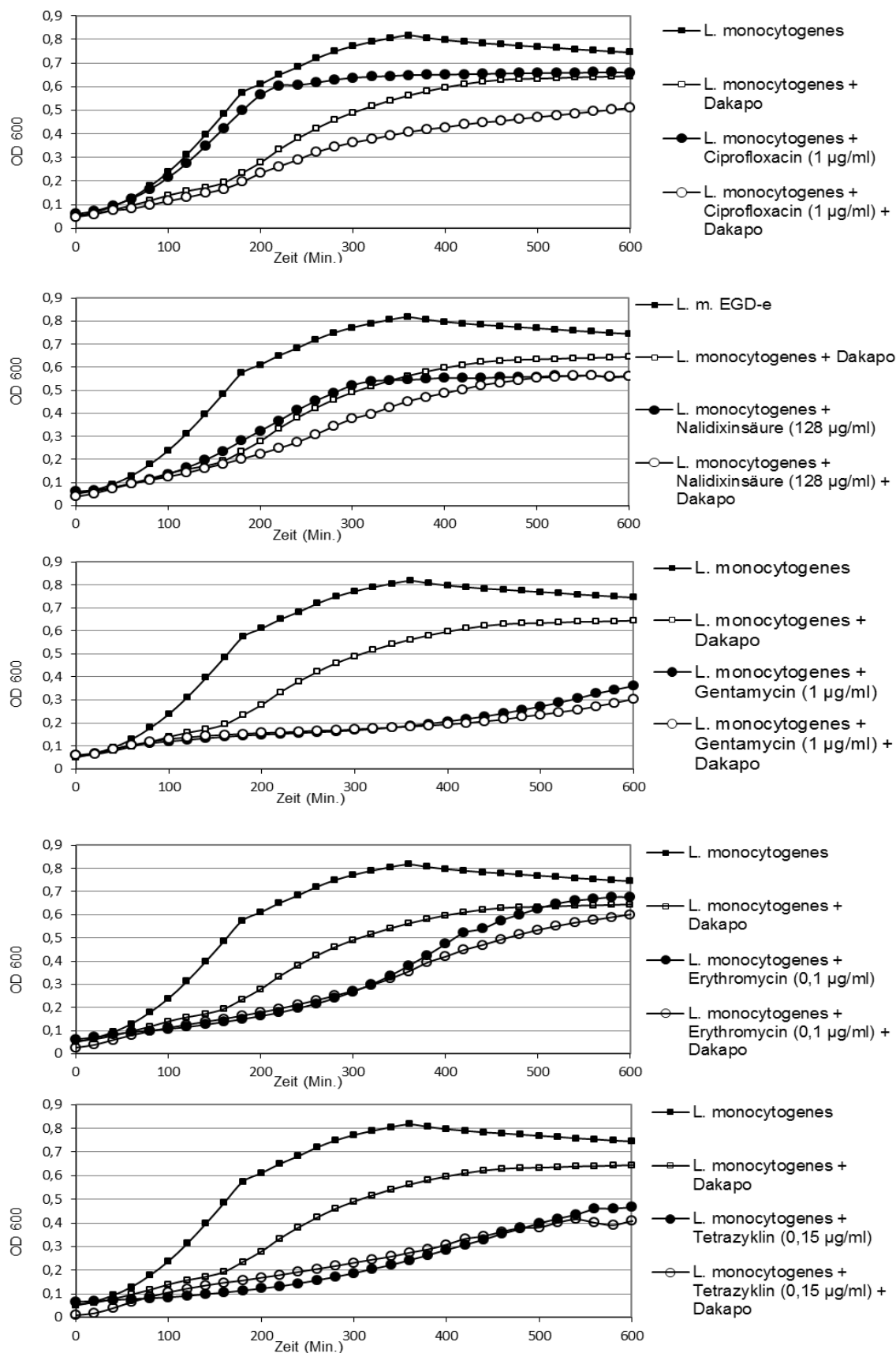
EAHEC (ST3305, Gießen) ohne *Dakapo*; RIN: 9,7

EAHEC (ST3305, Gießen) mit *Dakapo* (77 µM); RIN: 9,3

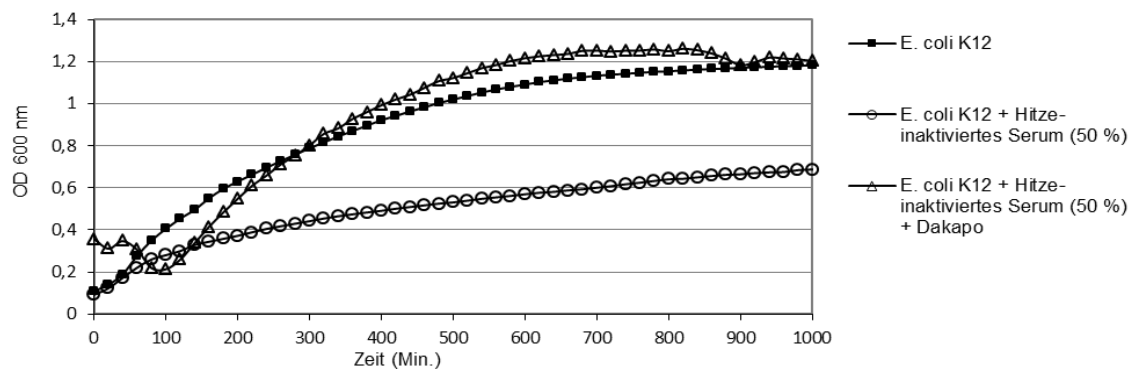
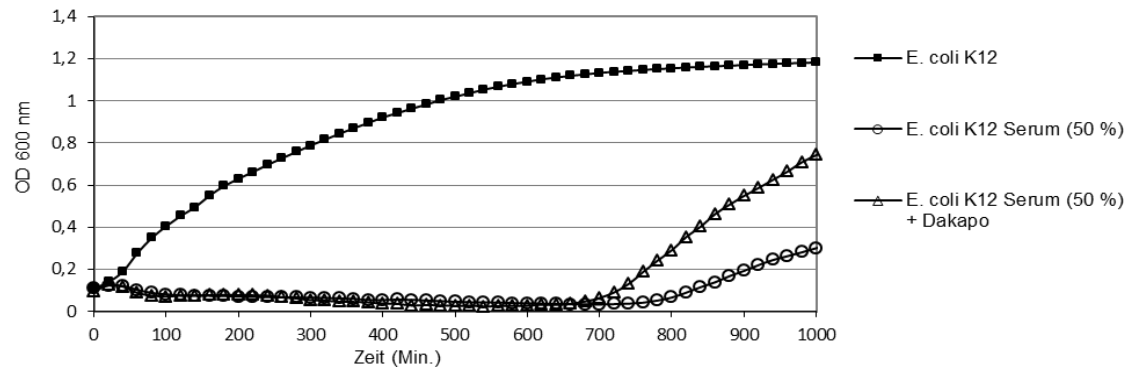
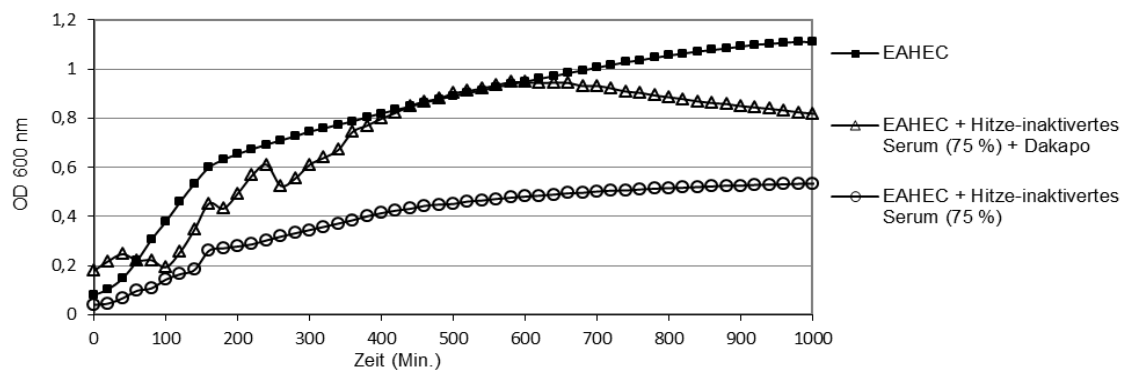
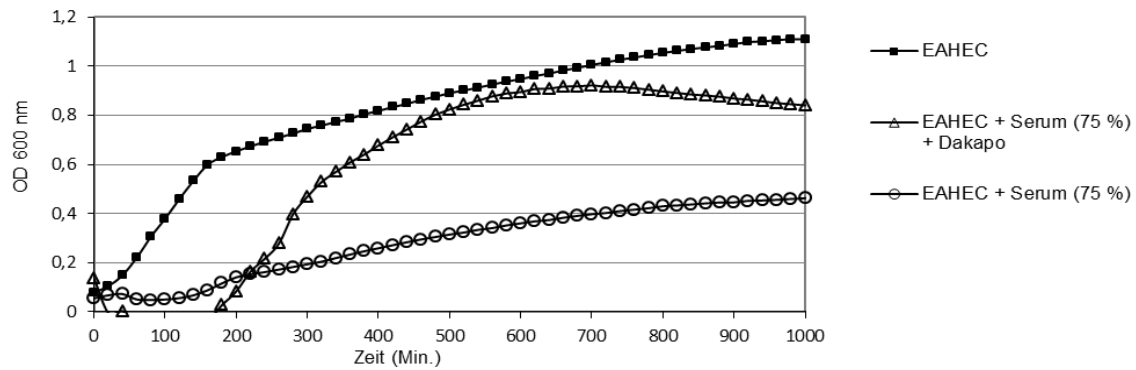
A8: Übersicht über Veränderungen in der Genexpression in *L. monocytogenes* EGD-e (Wt) durch *Dakapo*
(Analyse mit KEGG mapper, Billion, unveröffentlichte Software)



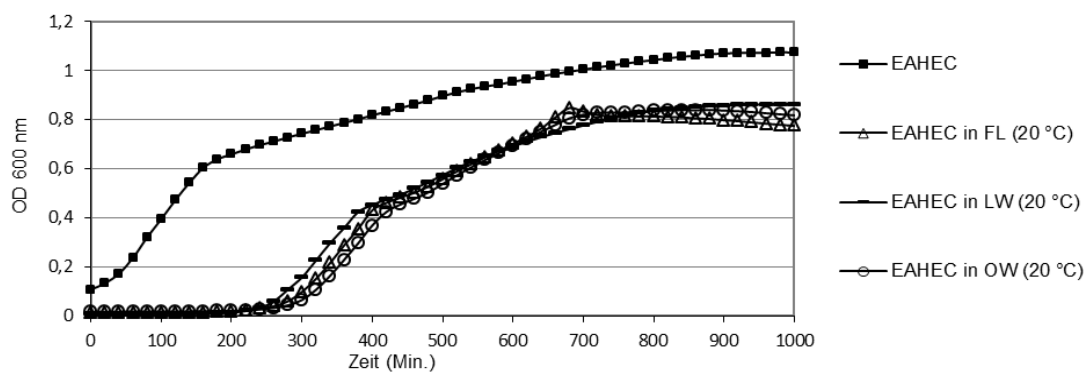
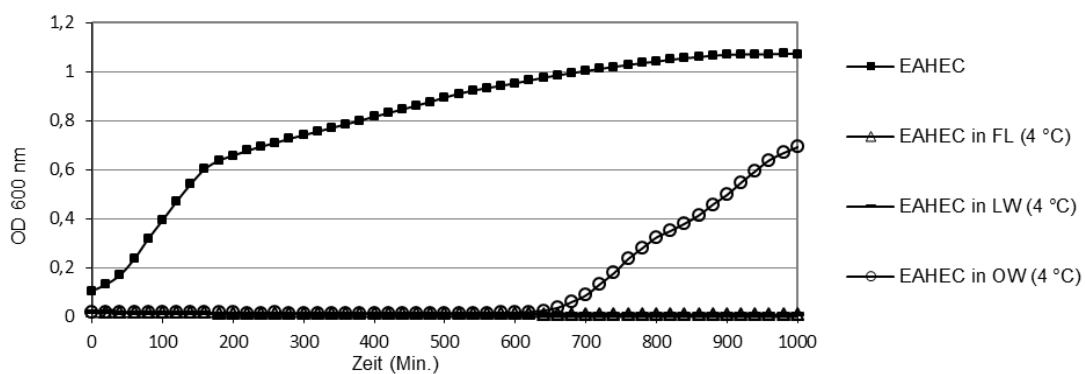
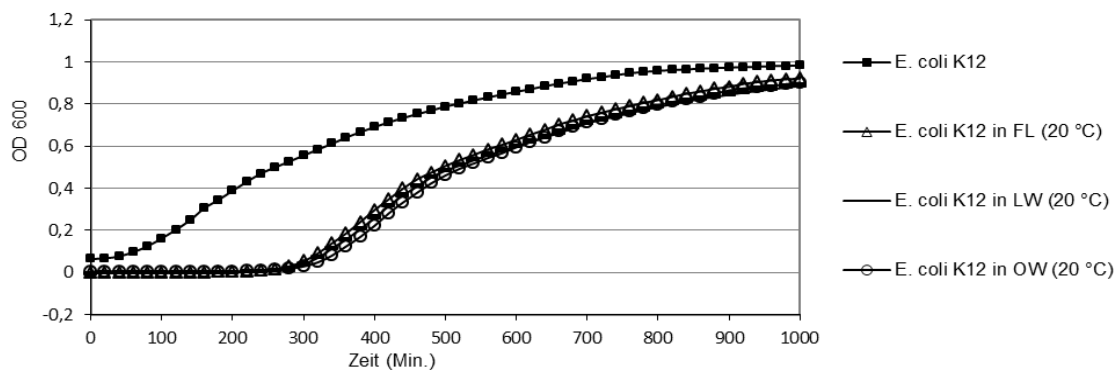
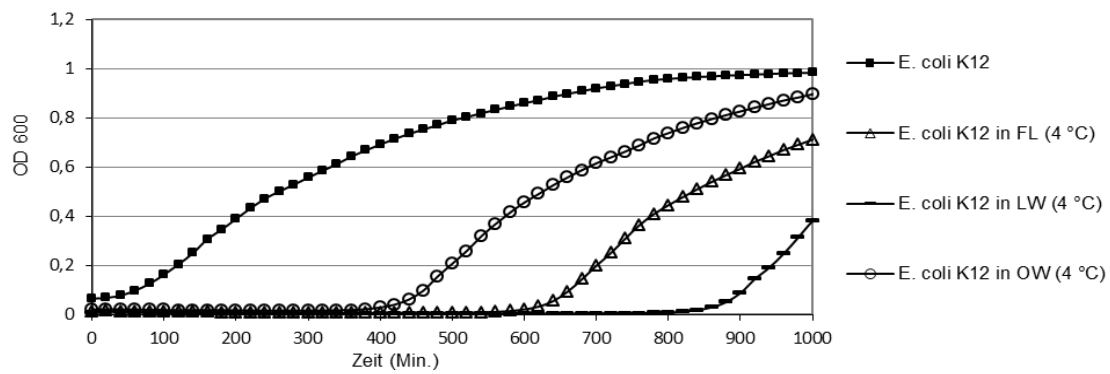
A9: Wirkung von Dakapo (77 μ M) auf die Suszeptibilität gegenüber verschiedenen Antibiotika in *L. monocytogenes* EGD-e (Wt)



A10: Untersuchungen zur Serumresistenz in EAHEC (ST3305, Gießen) und *E. coli* ECO1069 MG1655 in Kombination mit Dakapo (77 μ M)



A11: Persistenz von *E. coli* ECO1080 K12 (nach 500 Tagen) und EAHEC (ST3305, Gießen) (nach 610 Tagen) in verschiedenen Gewässern



14 Publikationsverzeichnis

Originalpublikationen

Herges L et al.: Anthocyanin-rich fruit extracts promote growth and pathogenesis of haemolytic uremic syndrome (HUS)-causing *Escherichia coli*. *in preparation*

Herges L et al.: Cooperative killing of *Listeria monocytogenes* by anthocyanins and antibiotics via oxidative stress. *in preparation*

Posterbeiträge

Herges L, Würdemann N, Limberg M, Chakraborty T, Domann E: *In vitro* and *in vivo* assays to analyse the anti-infective properties of plant extracts and AMPs from insects against miscellaneous bacteria. 4th Convergence of Life Science of the International Gießen Graduate Centre for the Life Sciences (GGL). Gießen. 21./22.09.2011.

Herges L, Hain T, Chakraborty T, Domann E: Activity of miscellaneous antimicrobial peptides (AMPs) against drug-resistant bacteria. 5th Convergence of Life Science of the International Gießen Graduate Centre for the Life Sciences (GGL). Gießen. 18./19.09.2012.

Domann E, Herges L, Chakraborty T: Aktivität verschiedener Anthocyan-haltiger Beerenextrakte auf Bakterien *in vitro* und im *Gallerien*-Infektionsmodell. 3. Statusseminar Ernährung. Berlin. 19.-21.11.2012.

15 Ehrenwörtliche Erklärung

"Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt oder indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden."

Gießen, 02.11.2014

Lea Herges

16 Danksagung

Die Labortätigkeiten zu der vorliegenden Arbeit wurden am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen von März 2011 bis Januar 2014 durchgeführt.

Besonders danken möchte ich an erster Stelle meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. E. Domann, für die Überlassung dieses sehr interessanten und relevanten Themas, für seine intensive Unterstützung und das entgegengebrachte Vertrauen während der gesamten Zeit meines Promotionsvorhabens. Herrn Prof. Dr. T. Chakraborty möchte ich meinen Dank für die zielführenden, wissenschaftlichen Diskussionen, sein Interesse an der Thematik und neue Forschungsimpulse aussprechen. Dem Initiator und Koordinator des LOEWE-Schwerpunktes „Insektenbiotechnologie“, Herrn Prof. Dr. A. Vilcinskas, danke ich für die Möglichkeit an diesem Kooperationsprojekt mitzuwirken, für die finanzielle Unterstützung und die Bereitstellung der Insektenpeptide. In diesem Zusammenhang danke ich ebenso für die Unterstützung aus dem BMBF-Verbundprojekt „Anthocyane in Fruchtsäften aus Beerenobst“ und die Bereitstellung der verwendeten Beerenextrakte.

Danken möchte ich den Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, die mich stets unterstützt haben, insbesondere Dr. M. Fritzenwanker, Dr. T. Hain und T. Schultze, die mir bei den Transkriptomexperimenten geholfen haben. Danken möchte ich ebenso den Spülfrauen, die mir oft den letzten Kolben für die Experimente gesichert haben, den Laboranten, Postdocs und meinen Mitdoktoranden für hilfreiche Tipps mit Chemikalien und "schwierigen" Bakterien, für viele wissenschaftliche und lustige Gespräche und für die schöne gemeinsame Zeit im und außerhalb des Labors. Insbesondere bedanken möchte ich mich bei Silke und Claudia, die immer ein offenes Ohr hatten und mir bei allen Fragen des (Labor)lebens mit Rat und Tat zur Seite standen.

Als Mitglied der *International Gießen Graduate Centre for the Life Sciences* (GGL), Sektion 2 *Infection and immunity* danke ich dem gesamten Organisationsteam der Graduiertenschule für die interessanten Veranstaltungen, an denen ich teilnehmen konnte, und für die durch dieses strukturierte Doktorandenprogramm geförderte Möglichkeit zum Austausch.

Speziell danken möchte ich Judith und Viki für ihr großes Interesse an meiner Arbeit und Steph und Jürgen für ihre Genauigkeit bei Textkorrekturen jeglicher Art sowie allen anderen fleißigen Korrekturlesern und -leserinnen.

Ganz besonderer Dank gilt zuletzt meinem Verlobten Sebastian, meinen Eltern und Geschwistern Julien und Jannik, die mich auf meinem Weg unterstützt haben.

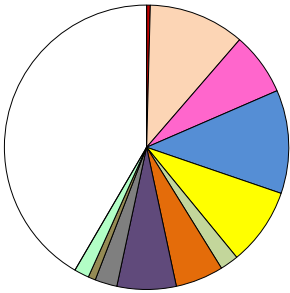
A12.1 Auswertung Transkriptomanalyse *Listeria monocytogenes* EGD-e; Vergleich der Genregulation nach Behandlung mit dem Anthocyan-reichen Traubenextrakt *Dokapo* (induzierte Gene)

Identifier	Genname	Fold change	Produkt	Funktion/Einordnung	Farbcodierung
lmo0536		42,07	hypothetical protein	Kohlenhydratmetabolismus	
lmo0018		28,48	beta-glucosidase	Kohlenhydratmetabolismus	
lmo0027		23,90	hypothetical protein	Kohlenhydratmetabolismus, PTS	
rli32	rli32	11,82		non-coding RNA	
lmo0517		10,00	hypothetical protein	Kohlenhydratmetabolismus, PTS	
lmo0261		9,85	hypothetical protein	Kohlenhydratmetabolismus	
lmo0243	sigH	9,59	RNA polymerase factor sigma-70	Regulation der Transkription	
rli55	rli55	6,24		non-coding RNA	
lmo001	lmo001	6,19		ribosomale RNA	
lmo1257		5,76	hypothetical protein	Phosphoesterase	
lmo1560	dnal	5,18	primosomal protein Dnal	Helikase, DNA-Replikation	
lmo2436		4,84	hypothetical protein	Regulation der Transkription	
lmo0051		4,81	hypothetical protein	Regulation der Transkription	
lmo2630	rplW	4,71	50S ribosomal protein L23	Ribonukleoprotein	
lmo0971	dtlD	4,64	DTD protein for D-alanine esterification of lipoteichoic acid and wall teichoic acid	Zellwandaufbau	
lmo0968	ppnK	4,49	inorganic polyphosphate/ATP-NAD kinase	Phosphorylierung	
lmo009	lmo009	4,45		ribosomale RNA	
lmo2627	rplV	4,41	50S ribosomal protein L22	Ribonukleoprotein	
lmo1259	proA	4,24	Gamma-glutamyl phosphate reductase	Aminosäurebiosynthese (Pro)	
lmo0289		4,16	hypothetical protein		
lmo2856	rpmH	4,10	50S ribosomal protein L34	Ribonukleoprotein	
lmo1222	pheT	3,97	phenylalanyl-tRNA synthetase beta subunit	Phenylalanyl-tRNA-Synthetase	
lmo1597		3,95	hypothetical protein	DNA-Polymerase	
lmo2620	rplE	3,94	50S ribosomal protein L5	Ribonukleoprotein	
lmo0485		3,92	hypothetical protein	Oxidations-Reduktions-Prozesse	
lmo2636		3,89	hypothetical protein		
lmo2616	rplR	3,88	50S ribosomal protein L18	Ribonukleoprotein	
lmo0319		3,85	hypothetical protein	Kohlenhydratmetabolismus	
lmo2622	rplN	3,85	50S ribosomal protein L14	Ribonukleoprotein	
lmo2267		3,84	hypothetical protein	Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen	
lmo0973	dtlB	3,83	DTB protein for D-alanine esterification of lipoteichoic acid and wall teichoic acid	Zellwandaufbau	
lmo0050		3,82	hypothetical protein	Ribosomenbiogenese	
lmo2705		3,81	hypothetical protein	DNA-Reparatur	
lmo0273		3,76	hypothetical protein	Hydrolase	
lmo0240		3,38	hypothetical protein	Ribosomenbiogenese	
rli44	rli44	3,37		non-coding RNA	
lmo2481		3,37	pyrophosphatase ppaX	Pyrophosphatase	
lmo1278	clpQ	3,36	ATP-dependent protease peptidase subunit	Hitzeschockprotein	
lmo0355		3,33	fumarate reductase flavoprotein subunit	Kohlenhydratmetabolismus	
lmo1984	ilvB	3,30	hypothetical protein	Aminosäurebiosynthese (Ile)	
lmo2253		3,24	hypothetical protein	Kohlenhydratmetabolismus	
lmo1364	cspL	3,23	hypothetical protein	Kälteschockprotein	
lmo2548	rpmE2	3,13	50S ribosomal protein L31 type B	Ribonukleoprotein	
lmo1081		3,09	hypothetical protein	Kohlenhydratmetabolismus	
lmo1556	hemC	3,06	Porphobilinogen deaminase	Porphyrimetabolismus	
lmo2618	rpsH	3,06	50S ribosomal protein S8	Ribonukleoprotein	
lmo0942		3,03	hypothetical protein	Hitzeschockprotein	
lmo1879	cspD	3,02	hypothetical protein	Kälteschockprotein	
lmo2621	rplK	3,00	50S ribosomal protein L24	Ribonukleoprotein	
lmo1390		2,96	hypothetical protein	Transporter	
lmo1363		2,96	hypothetical protein		
SAM	SAM (lmo_extended_transcriptome_3 309209..309408)	2,96		Methyltransferase	
lmo1280	codY	2,96			
lmo1294	miaA	2,95	hypothetical protein	Regulation der Transkription	
lmo2541		2,94	hypothetical protein		
lmo1457		2,93	hypothetical protein		
lmo1851		2,91	hypothetical protein	Proteolyse	
ssrS	ssrS	2,88		non-coding RNA	
lmo1455	dnaG	2,86	DNA primase	Primase	
lmo2504		2,84	hypothetical protein	Kohlenhydratmetabolismus	
lmo1799		2,84	peptidoglycan binding protein	Peptidoglykan-gebundenes Protein	
lmo1359	nusB	2,82	transcription antitermination protein NusB	Regulation der Transkription	
lmo1693	recX	2,82	recombination regulator recX	Regulation der DNA-Reparatur	
lmo1014	gbuA	2,82	hypothetical protein	Transporter	
lmo1090		2,80	hypothetical protein	Zuckertransporter	
lmo1783	rplT	2,79	50S ribosomal protein L20	Ribonukleoprotein	
T-box	T-box (lmo_extended_transcriptome_3 1711307..1711555)	2,79		T-box-Gen	
lmo2617	rplF	2,77	50S ribosomal protein L6	Ribonukleoprotein	
lmo1293	glpD	2,77	hypothetical protein	Glycerol-3-Phosphat-Metabolismus	
lmo0162		2,75	DNA polymerase III subunit delta	DNA-Polymerase, DNA-Replikation	
lmo1091		2,74	hypothetical protein	Kohlenhydratmetabolismus	
lmo1321		2,73	hypothetical protein	Ribosomenbiogenese	
lmo1757		2,72	hypothetical protein	Aminosäurebiosynthese (Glu)	
lmo1935		2,70	hypothetical protein	Diguanylatcyclase	
lmo2574		2,70	hypothetical protein	Homoserindehydrogenase	
lmo2534	atpE	2,70	FOF1 ATP synthase subunit C	Protonentransport	
lmo2545	thrB	2,68	homoserine kinase	Aminosäurebiosynthese (Thr)	
lmo2823		2,68	hypothetical protein		
lmo0242		2,68	hypothetical protein	Ribonuklease	
lmo1796		2,67	hypothetical protein	Adenylosuccinylase	
lmo2351	FMN	2,66	hypothetical protein	FMN-Reduktase	
lmo0974	dtlA	2,64	D-alanine-D-alanyl carrier protein ligase	Zellwandaufbau	
lmo0917		2,62	hypothetical protein	Kohlenhydratmetabolismus	
lmo1271		2,61	hypothetical protein	Proteolyse	
T-box	T-box (lmo_extended_transcriptome_3 1588878..1589139)	2,57	T-box	T-box-Gen	
lmo1554	hemB	2,57	Delta-aminolevulinic acid dehydratase	Porphyrimetabolismus	
lmo2854		2,56	hypothetical protein	Proteintransport	
lmo1400		2,56	hypothetical protein	N-Acetyltransferaseaktivität	
lmo1710		2,56	hypothetical protein	Oxidations-Reduktions-Prozesse	
lmo1460	recO	2,55	DNA repair protein RecO	DNA-Reparatur	
lmo1488		2,55	hypothetical protein	Pyridinnukleotidbiosynthese	
rli105	rli105	2,54		Hitzeschockprotein	
lmo2788	bvrA	2,54	transcription antiterminator	Regulation der Transkription	
lmo0136		2,54	hypothetical protein	Transporter	
lmo1028		2,54	hypothetical protein	Transporter	
lmo2662		2,54	hypothetical protein	Kohlenhydratmetabolismus	
lmo1079		2,53	hypothetical protein	Magnesiumtransporter	
lmo0540		2,53	hypothetical protein	Penicillin-bindendes Protein	
lmo0391		2,53	hypothetical protein	Aminosäurebiosynthese (Val, Leu, Ile)	
lmo2555		2,51	hypothetical protein	Protonentransport	
lmo1899	dinG	2,50	bifunctional ATP-dependent DNA helicase/DNA polymerase III subunit epsilon	DNA-Reparatur, DNA-Replikation	
lmo2718	cydA	2,50	hypothetical protein	Transporter	
lmo1644		2,49	hypothetical protein	Helikase	
lmo0230		2,49	hypothetical protein	Lysyl-tRNA-Synthetase	
lmo1736		2,48	hypothetical protein	Hitzeschockprotein, Chaperon	
lmo2261		2,48	hypothetical protein	Aminosäurebiosynthese (Phe, Tyr, Trp)	
lmo0484		2,47	heme-degrading monooxygenase IsdG	Eisenassimilation	
lmo1279	hslU	2,46	ATP-dependent protease ATP-binding subunit	Hitzeschockprotein	
lmo0992		2,43	hypothetical protein	Enterocellinesterase	
lmo1529		2,43	hypothetical protein	Regulation der Transkription	
lmo2581		2,43	hypothetical protein	Kohlenhydratmetabolismus	
lmo2773		2,43	hypothetical protein	Regulation der Transkription	
	rnpB	2,42			
lmo1936	gpsA	2,41	hypothetical protein	Glycerophospholipidmetabolismus	
lmo2035	murG	2,41	N-acetylglucosaminyl transferase	Zellwandaufbau	
lmo1070		2,40	hypothetical protein	Dihydroliipoamiddihydrogenase	
lmo1097		2,40	hypothetical protein	DNA-Integration	
lmo2427		2,39	hypothetical protein	Kohlenhydratmetabolismus	
lmo2374		2,39	ssarate kinase	Aminosäurebiosynthese (Lys, Met, The)	
lmo2628	rpsS	2,39	50S ribosomal protein S19	Ribonukleoprotein	
lmo2217		2,37	hypothetical protein	Oligopeptidtransport	
lmo2853		2,35	hypothetical protein		
lmo1759	pcrA	2,35	ATP-dependent DNA helicase	DNA-Replikation, Helikase	
lmo1361	xseA	2,35	exodeoxyribonuclease VII large subunit	Exodeoxyribonuclease	

	LhrA		2.35		
lmo1552	valS		2.34	valyl-tRNA synthetase	Aminoacyl-tRNA-Synthetase
lmo2533	atpF		2.33	F1F0 ATP synthase subunit B	Protonentransport
lmo0516			2.33	hypothetical protein	Kohlenhydratmetabolismus, PTS
lmo1745			2.33	hypothetical protein	Regulation der Transkription
lmo2565			2.31	hypothetical protein	Uracilphosphoribosyltransferase
lmo0560			2.31	glutamate dehydrogenase	Aminosäurebiosynthese (Glu)
lmo0415			2.30	hypothetical protein	Kohlenhydratmetabolismus
rli28	rli28		2.29		non-coding RNA
lmo0237	glxX		2.28	hypothetical protein	Glutaryl-tRNA Synthetase
lmo2598	truA		2.27	tRNA pseudouridine synthase A	Pseudouridinsynthese
lmo0737			2.27	hypothetical protein	Peptidoglykan-gebundenes Protein
lmo1080			2.27	hypothetical protein	Zellwandaufbau
lmo1334			2.26	hypothetical protein	Ribosomenrecyclingfaktor
lmo1502			2.26	hypothetical protein	DNA-Reparatur, DNA-Rekombination
lmo0152			2.25	hypothetical protein	Oligopeptidtransport
lmo2048			2.23	hypothetical protein	Quinolinsynthetase
lmo1600	aroA		2.23	bifunctional 3-deoxy-7-phosphoheptulosonate synthase/chorismate mutase	Aminosäurebiosynthese (Phe, Tyr)
lmo1405			2.22	hypothetical protein	Regulation der Transkription
lmo1272	rbgA		2.21	ribosomal biosynthesis GTPase	Ribosomenbiogenese
lmo2168			2.20	hypothetical protein	Membranprotein
lmo1891	recU		2.20	Holliday junction specific endonuclease	DNA-Reparatur, DNA-Rekombination
lmo2623	rpsQ		2.19	30S ribosomal protein S17	Ribonukleoprotein
lmo0970			2.19	Enoyl-acyl-carrier-protein reductase	Fettsäurebiosynthese
lmo1324			2.19	hypothetical protein	
lmo2154	nrdF		2.17	Ribonucleotide-diphosphate reductase subunit beta	Regulation der Transkription
lmo0666			2.16	hypothetical protein	
lmo0842			2.16	peptidoglycan binding protein	Peptidoglykangebundenes Protein
lmo1705			2.16		Phosphotransferaseaktivität
lmo2637			2.15	hypothetical protein	Transporter
lmo1782			2.14	hypothetical protein	DNA-Reparatur
lmo0941			2.13	hypothetical protein	
lmo2160			2.13	hypothetical protein	Kohlenhydratmetabolismus, PTS
lmo0394			2.12	hypothetical protein	
lmo2268	addB		2.12	hypothetical protein	Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen
lmo1507			2.12	hypothetical protein	Regulation der Transkription
lmo1086	ispD (lmo_extended_transcriptome_3_255799..256498)		2.12	2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase	Isoprenbiosynthese, Zellteilungsprotein
lmo1010			2.10	hypothetical protein	Regulation der Transkription
lmo1561	dnaB		2.10	Chromosome replication initiation / membrane attachment protein DnaB	Replikation
lmo0922			2.09	pantothenate kinase	Coenzym-A-Biosynthese
lmo0999			2.09	hypothetical protein	
lmo1335	rpmG (lmo_extended_transcriptome_3_1363825..1363975)		2.08	50S ribosomal protein L33	Ribonukleoprotein
lmo0108			2.07	hypothetical protein	Transporter
lmo1645			2.07	hypothetical protein	
lmo1922			2.07	hypothetical protein	Helikase
lmo2730			2.06	hypothetical protein	Phosphoglykolatphosphatase
lmo2717	cydB		2.06	hypothetical protein	Transporter
lmo2152			2.06	hypothetical protein	Zellredoxhomöostase
lmo0048			2.06	putative accessory gene regulator protein	Transporter, Quorum sensing
lmo1333			2.06	hypothetical protein	Uridylkinase
lmo1239			2.06	hypothetical protein	Nukleosiddiphosphataseaktivität
lmo0272			2.05	hypothetical protein	Kohlenhydratmetabolismus
lmo1385			2.05	hypothetical protein	Deoxyxylulose-5-Phosphatsynthase
lmo2561	argS		2.05	arginyl-tRNA-synthetase	Arginyl-tRNA-Synthetase
lmo1907	dapB		2.05	dihydrodipicolinate reductase	Aminosäurebiosynthese (Lys)
lmo0241			2.04	hypothetical protein	Cysteinyl-tRNA-Synthetase
lmo0528			2.04	hypothetical protein	Transporter
lmo1510			2.04	hypothetical protein	Nicotinatnukleotidadenylyltransferase
lmo1490			2.03	hypothetical protein	Aminosäurebiosynthese (aromat. As)
lmo1492			2.03	hypothetical protein	Hydrolaseaktivität
lmo0943	fri		2.03	none-heme iron-binding ferritin	Eisenspeicherung
lmo1389			2.03	hypothetical protein	Zuckertransporter
lmo2417			2.02	hypothetical protein	Transporter
lmo1017			2.02	hypothetical protein	Transporter, PTS
lmo0529			2.02	hypothetical protein	Regulation der Transkription
lmo1817			2.02	hypothetical protein	Thiamindiphosphatbiosynthese
lmo1940			2.01	hypothetical protein	zellulärer Aminosäuremetabolismus
lmo1370			2.00	butyrate kinase	Butyratkinaseaktivität
lmo2480			2.00	hypothetical protein	Acetoincleavingssystem
lmo2625	rplP		2.00	50S ribosomal protein L16	Ribonukleoprotein
lmo2651			2.00	hypothetical protein	Kohlenhydratmetabolismus, PTS
lmo2056			2.00	hypothetical protein	Zelluläusprotein
lmo1871			1.99	hypothetical protein	Kohlenhydratmetabolismus
lmo1119			1.99	hypothetical protein	DNA-Methylierung
lmo0887			1.99	hypothetical protein	Kohlenhydratmetabolismus, PTS
lmo1856	deoD		1.99	purine nucleoside phosphorylase	Purinukleosiddiphosphorylase
lmo1858			1.98	hypothetical protein	Oxidoreduktase
lmo1764	purD		1.98	phosphoribosylamin-glycine ligase	Purinbiosynthese
lmo2649	ulaA (lmo_extended_transcriptome_3_2721558..2722857)		1.98	ascorbate-specific PTS system enzyme IIC	Transporter, PTS
lmo1423			1.97	hypothetical protein	DNA-Mismatch-Reparaturprotein
lmo2105			1.97	hypothetical protein	Eisentransport
lmo0199	prs (lmo_extended_transcriptome_3_543201..544137)		1.97	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase	Nukleotidbiosynthese
lmo1562			1.97	Transcriptional regulator NrdR	Regulation der Transkription
lmo0967			1.97	hypothetical protein	Guanosintetraphosphatmetabolismus
lmo0217			1.97		Zellzyklus
lmo2547	hom		1.96	homoserine dehydrogenase	Aminosäurebiosynthese (Homoserin)
lmo2524			1.96	hypothetical protein	Transporter
T-box	T-box (lmo_extended_transcriptome_3_1597191..1597455)		1.96		T-box-Gen
lmo1905	cca		1.96	tRNA CCA-pyrophosphorylase	RNA-Reparatur, tRNA-Prozessierung
lmo0005	recF		1.96	recombination protein F	DNA-Reparatur, DNA-Replikation
lmo0434	inlB		1.96	internalin B	Virulenzfaktor, Invasionsprotein
lmo2046			1.96	2-dehydropanoate 2-reductase	Pantothenatbiosynthese
lmo2790	parB		1.96	Partition protein ParB homolog	Partitionsprotein
lmo2359			1.95	hypothetical protein	Kohlenhydratmetabolismus, PTS
lmo2054			1.95	hypothetical protein	Alanimracemase
lmo2761			1.95	hypothetical protein	Kohlenhydratmetabolismus
lmo1754	gatB		1.95	aspartyl/glutamyl-tRNA amidotransferase subunit B	Aminosäurebiosynthese
lmo0164			1.95		DNA-Replikation
lmo1857			1.95	hypothetical protein	Dihydroorotatdehydrogenase
lmo2771			1.95	hypothetical protein	Kohlenhydratmetabolismus
lmo2714			1.93	peptidoglycan bound protein	Peptidoglykangebundenes Protein
lmo1820			1.93	hypothetical protein	
lmo2626	rpsC		1.93	30S ribosomal protein S3	Ribonukleoprotein
lmo1862			1.93	hypothetical protein	Transporter
lmo1814			1.92	hypothetical protein	Glycerolmetabolismus
rli62	rli62		1.92		non-coding RNA
lmo1603			1.92	hypothetical protein	Universalstressprotein, Proteolyse
lmo1541			1.91	hypothetical protein	Aspartyl-tRNA-Synthetase
lmo1314	frr		1.91	hypothetical protein	Ribosomenrecyclingfaktor
lmo2665			1.91	hypothetical protein	Kohlenhydratmetabolismus, PTS
lmo0107			1.91	hypothetical protein	Transporter
lmo2266			1.90	hypothetical protein	Regulation der Transkription
lmo1727			1.90	hypothetical protein	Regulation der Transkription
lmo1845			1.90	hypothetical protein	Transporter

Eisenspeicherung	1
Kohlenhydratmetabolismus	26
Regulator der Transkription	17
Transporter	28
Stressantwort, Reparaturmechanismen	21
Zellwandaufbau	5
Aminosäuresynthese	13
Ribonukleoprotein	16
nicht-kodierende RNA	6
ribosomale RNA	2
Ribosomenbiogenese	4
andere	99
gesamt	238

238 Gene sind nach den Kriterien "mindestens 10 reads, Fold change ab 1,9
(gerundet auf zwei Nachkommastellen)" durch Dakapo hochreguliert



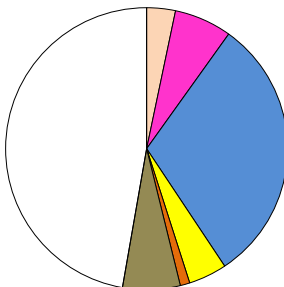
- Eisenspeicherung
- Kohlenhydratmetabolismus
- Regulator der Transkription
- Transporter
- Stressantwort, Reparaturmechanismen
- Zellwandaufbau
- Aminosäuresynthese
- Ribonukleoprotein
- non-coding RNA
- ribosomale RNA
- Ribosomenbiogenese
- andere

A12.2 Auswertung Transkriptomanalyse *Listeria monocytogenes* EGD-e; Vergleich der Genregulation nach Behandlung mit dem Anthocyan-reichen Traubenextrakt *Dakapo* (Inhibierte Gene)

Identifier	Genname	Fold change	Produkt	Funktion/Einordnung	Farbcodierung
lmo1113		-7.40	hypothetical protein		
lmo08	lmo08	-7.24		ribosomale RNA	
lmo11	lmo11	-6.59		ribosomale RNA	
lmo05	lmo05	-6.54		ribosomale RNA	
lmo0641		-5.79	hypothetical protein	Metallionentransport	
lmo0995		-5.16		Transporter	
lmo0587		-4.51	putative secreted protein		
lmo0642		-4.09	hypothetical protein	Transporter, PTS	
lmo0629		-4.07	hypothetical protein		
lmo1300		-3.90	hypothetical protein	Arsenittransport	
lmo0783		-3.78	hypothetical protein	Transporter, PTS	
lmo17	lmo17	-3.62		ribosomale RNA	
lmo02	lmo02	-3.50		ribosomale RNA	
lmo0610		-3.46		Peptidoglykan-gebundenes Protein	
lmo2724		-3.35	hypothetical protein	Dihydroxyacetonkinase	
lmo0221		-3.33	pantothenate kinase	Panthotensäure-Biosynthese	
lmo2434		-3.23	hypothetical protein	Glutamatstoffwechsel	
lmo0376		-3.14	hypothetical protein	Regulation der Transkription	
lmo2157	sepA	-3.13	hypothetical protein	Kohlenhydratmetabolismus	
lmo14	lmo14	-3.11		ribosomale RNA	
anti0648-2	anti0648-2	-3.06		anti0648-2	
lmo2191	spxA	-3.03	transcriptional regulator Spx	Thiolhomöostase, Transkriptionsregulation	
lmo0654		-2.98	hypothetical protein	Sulfatase	
lmo1422		-2.94	hypothetical protein	Transporter	
lmo2485		-2.94	hypothetical protein	Phosphoglyceratkinase	
lmo2391		-2.92	hypothetical protein	Epimerase, Dehydratase	
lmo0880		-2.92	hypothetical protein	Zellwandkatabolismus	
lmo2398	ltrC	-2.89	hypothetical protein	Sulfat-/Thiosulfatimport	
lmo1241		-2.87	hypothetical protein	Transporter	
lmo2673		-2.84	hypothetical protein	Stressantwort	
lmo0729		-2.83	hypothetical protein	Mureintransglykosylase	
lmo1912		-2.81	hypothetical protein	intrazelluläre Signaltransduktion	
lmo0998		-2.79	hypothetical protein	Glutathionperoxidase	
lmo0555		-2.71	hypothetical protein	Oligopeptidtransport	
lmo0554		-2.71	hypothetical protein	Oxidoreduktaseaktivität	
lmo0439		-2.70	hypothetical protein	Internalin A Präkursor	
lmo1803	SRP	-2.54	hypothetical protein	Signalreognitionpartikel	
lmo0724		-2.47	hypothetical protein	Flagellenprotein	
lmo0539		-2.46	tagatose 1,6-diphosphate aldolase	Kohlenhydratmetabolismus	
lmo1225		-2.43	hypothetical protein	Regulation der Transkription	
lmo0524		-2.43	hypothetical protein	Sulfattransporter	
lmo2570		-2.41	hypothetical protein	Peptidketten-Release-Faktor	
lmo2602		-2.40	hypothetical protein	Zinktransporter	
lmo0325		-2.34	hypothetical protein	Regulation der Transkription	
lmo0819		-2.34	hypothetical protein	Putrescitransport	
lmo1833	pyrD	-2.34	dihydroorotate dehydrogenase 1B	Pyrimidinbiosynthese	
lmo0722		-2.31	pyruvate oxidase	Pyruvatoxidase	
lmo0593		-2.29	hypothetical protein	Transporter	
lmo2441		-2.25	hypothetical protein	Transporter	
lmo2571		-2.25	hypothetical protein	Nikotinamidase	
lmo1694		-2.21	hypothetical protein	Transporter	
lmo0405		-2.21	hypothetical protein	Transporter	
lmo0596		-2.21	hypothetical protein	Adhäsion	
lmo0913		-2.20	hypothetical protein	Oxidoreduktase	
lmo0019		-2.20	hypothetical protein		
lmo2695		-2.19	hypothetical protein	Transporter	
lmo1375		-2.19	hypothetical protein	Translationelongationsfaktor	
lmo0595		-2.18	hypothetical protein	Homoserinacetyl-sulfhydrase	
lmo0210	ldh	-2.17	L-lactate dehydrogenase	Kohlenhydratmetabolismus	
lmo2697		-2.16	hypothetical protein	Transporter, PTS	
lmo2640		-2.15	hypothetical protein	Adenylatkinase	
lmo0567	hisD	-2.14	histidinol dehydrogenase	Aminosäurebiosynthese (His)	
lmo0782		-2.14	hypothetical protein	Transporter, PTS	
lmo0723		-2.12	hypothetical protein	Chemotaxisprotein	
lmo0158		-2.11	hypothetical protein	Hydrolase	
lmo2572		-2.11	hypothetical protein	Riboflavinbiosynthese	
lmo2259		-2.10	hypothetical protein	Transporter, PTS	
lmo0584		-2.08	hypothetical protein	Regulation der Transkription	
lmo0411		-2.07	phosphoenolpyruvate synthase	Phosphoenolpyruvat synthase	
lmo1140		-2.07	hypothetical protein		
lmo0674		-2.07	hypothetical protein	Regulation der Transkription	
lmo0263	iniH	-2.07	internalin H	Virulenzfaktor, Invasionsprotein	
lmo0994		-2.07	hypothetical protein	Sulfat-/Thiosulfatimport	
lmo2400		-2.05	hypothetical protein	Acetyltransferase	
lmo2733		-2.05	hypothetical protein	Transporter, PTS	
lmo0953		-2.05	hypothetical protein		
lmo0795		-2.03	hypothetical protein	Transporter	
lmo2495		-2.03	hypothetical protein	Transporter	
lmo1580		-2.02	hypothetical protein	Stressantwort	
lmo2213		-2.00	hypothetical protein	Oligopeptidase	
lmo0099		-1.98	hypothetical protein		
lmo2696		-1.96	hypothetical protein	Glycerolmetabolismus	
lmo0648		-1.95	hypothetical protein	Transporter	
lmo1914		-1.94	hypothetical protein	Rekombinationsprotein	
lmo0811		-1.94	hypothetical protein		
lmo1439	sod	-1.93	superoxide dismutase	Abbau von oxidativem Stress	
lmo2454		-1.93	hypothetical protein	Zellteilungsprotein	
lmo1040		-1.93	hypothetical protein	Transporter	
lmo1027		-1.93	lmo1027 protein	Hydrolase	
lmo0013	qoxA	-1.92	AA3-600 quinol oxidase subunit II	Quinoloxidase, Transporter	
lmo0912		-1.90	hypothetical protein	Transporter	

Eisenspeicherung	3
Kohlenhydratmetabolismus	6
Regulator der Transkription	28
Transporter	4
Stressantwort, Reparatur	0
Zellwandaufbau	1
Aminosäuresynthese	0
Ribonukleoprotein	0
nicht-kodierende RNA	0
ribosomale RNA	6
Ribosomenbiogenese	0
andere	43
gesamt	91

91 Gene sind nach den Kriterien "mindestens 10 reads, Fold change ab 1,9 (gerundet auf zwei Nachkommastellen)" durch *Dakapo* runterreguliert

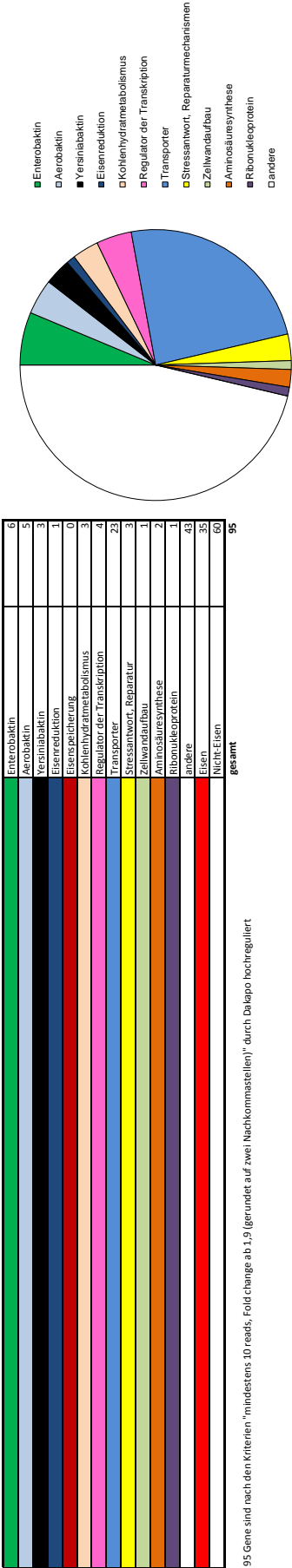


- Kohlenhydratmetabolismus
- Regulator der Transkription
- Transporter
- Stressantwort, Reparaturmechanismen
- Aminosäuresynthese
- ribosomale RNA
- andere

A13.1 Auswertung Transkriptomanalyse EAHc (ST3805, Giesen). Vergleich der Genregulation nach Behandlung mit dem Anthocyan-reichen Traubenextrakt Dokyzo (Induzierte Gene)

Feature ID	Produkt (aus CLC, Beibehalten)	Expression in E. coli K12	Fold change	Funktion/Einordnung	Farbcodierung	Eisenmetabolismus
HUS2011C_0603	COG4771: Outer membrane receptor for ferrienterochelin and colicins (consensus. sequence-1.634689..636930)	b0584, ferP	22.95	Enterobaktinrezeptor, Eisenaufnahme		für reguliert
HUS2011C_0607	Enterobaktin synthetase component F, serine activating enzyme	b0586, entF	21.44	Enterobaktinbiosynthese		für reguliert
HUS2011C_1201	COG4771: Outer membrane receptor for ferrienterochelin and colicins (consensus. sequence-1.1236567..1238577)	b0594, entE	18.19	Enterobaktinrezeptor, Eisenaufnahme		für reguliert
HUS2011C_0815	2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase	FG00638561: hypothetical protein	17.70	Enterobaktinbiosynthese		für reguliert
HUS2011C_1741	FG00638561: hypothetical protein	b1452, ynfCE	15.03			
HUS2011C_0617	2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate dehydrogenase (enterobactin) siderophore	b0596, entA	14.45	Enterobaktinbiosynthese		für reguliert
HUS2011C_1370	Purative OMR family iron siderophore receptor precursor	b1102, fruJ	12.73	Vorläufer Eisensiderophorerezeptor		für reguliert
HUS2011C_2665	Colicin I receptor precursor	b2155, cirA	9.00	Elementtransport		für reguliert
HUS2011C_5226	FerriC reductase	b4367, fruF	8.97	Eisenreduktion		für reguliert
HUS2011C_4925	Citrate-6-N-acetyl-6-hydroxy-L-lysine ligase, alpha subunit, aerobactin biosynthesis protein lucA, Siderophore synthetase superfamily, group C		7.99	Aerobaktinbiosynthese		
HUS2011C_4927	Citrate-6-N-acetyl-6-hydroxy-L-lysine ligase, alpha subunit, aerobactin biosynthesis protein lucA, Siderophore synthetase superfamily, group A		6.97	Aerobaktinbiosynthese		für reguliert
HUS2011C_2482	Iron acquisition outer membrane yersiniabactin receptor (YUA-YusJ) yersin receptor		6.56	Eisenakquisition+Yersiniabaktinrezeptor		für reguliert
HUS2011C_1308	FerriC siderophore transport system, periplasmic binding protein TonB		6.07	Eisentransport		für reguliert
HUS2011C_4926	6-hydroxylysine O-acetyltransferase, aerobactin biosynthesis protein lucB, Siderophore synthetase small component, acetyltransferase	b1252, tonB				
HUS2011C_0613	FerriC enterobactin-binding periplasmic protein FejB	b0592, ferB	5.69	Eisenenterobaktin-bindendes Protein		für reguliert
HUS2011C_3656	Biopolymer transport protein FcbD/TolR	b3005, exbD	5.03	Biopolymertransportprotein		für reguliert
HUS2011C_0156	FerriC hydroxamate outer membrane receptor FruA	b0150, fruA	4.73	Eisenhydroxamatemembranrezeptor		für reguliert
HUS2011C_4924	L-lysine 6-monooxygenase [NADPH], aerobactin biosynthesis protein lucD, Siderophore biosynthesis protein, monooxygenase		4.68	Aerobaktinbiosynthese		
HUS2011C_5068	Mobile element protein (consensus. sequence-1.5101532..5102024)		4.45	mobiles Elementprotein		
HUS2011C_1175	Ferrous iron transport periplasmic protein EfeO, contains peptidase-M75 domain and (frequently) cupredoxin-like domain	b1018, efeO	4.42	Eisen(Fe2+)Transportprotein		
HUS2011C_0157	FerriC hydroxamate ABC transporter, ATP-binding protein FruC	b0151, fruC	4.33	Eisen(Fe3+)HydroxamatABC-Transporter		für reguliert
HUS2011C_2889	RND efflux system, inner membrane transporter CmeB (consensus. sequence-1.2979888..2983002)	b0259, insH; b0552, insH; b0656, b1019, efeB	4.26	Effluxsystem, Innermembrantransporter		
HUS2011C_2145	Mobile element protein (consensus. sequence-1.2735134..2736115)		4.14	mobiles Elementprotein		
HUS2011C_1176	Ferrous iron transport peroxidase EfeB		4.14	Eisen(Fe2+)Transportperoxidase		für reguliert
HUS2011C_1321	MnxC protein		3.81	MnxC-Protein		
HUS2011C_1174	Ferrous iron transport permiase EfeU		3.80	Eisen(Fe2+)Transportpermiase		für reguliert
HUS2011C_0159	FerriC hydroxamate ABC transporter, permiase component FruB	b0153, fruB	3.50	EisenhydroxamatABC-Transporter		für reguliert
HUS2011C_0881	FerriChrome-iron receptor	b0805, fru	3.40	Ferrichromesenrezeptor		für reguliert
HUS2011C_3657	MoA/TolC/FcbD protein channel family protein (consensus. sequence-1.3653028..3653763)	b3006, exbB	3.31	MoA/TolC/FcbD-Proteinkanalanprotein		für reguliert
HUS2011C_3178	Ribonucleotide reductase of class Ib (aerobic), alpha subunit	b2675, nrde	3.24	Ribonukleotidreduktase Klasse Ib		für reguliert
HUS2011C_4928	FG00639052: hypothetical protein		3.13			
HUS2011C_2457	Iron acquisition yersiniabactin synthesis enzyme (lrp2) (consensus. sequence-1.2405721..2411829)		3.11	Eisenakquisition-Yersiniabaktinsynthese		für reguliert
HUS2011C_4676	Manganese superoxide dismutase	b3908, sodA	2.99	Mangansuperoxiddismutase		für reguliert
HUS2011C_0158	FerriC hydroxamate ABC transporter, periplasmic substrate binding protein FruD	b0152, fruD	2.98	FerrichydroxamatABC-Transporter		für reguliert
HUS2011C_5158	RNA polymerase sigma factor FecI	b4293, fecI	2.98	Regulation des Differenzialtr transporters		
HUS2011C_4395	S-methyltetrahydropteroylglutamate-homocysteine methyltransferase	b3829, metE	2.84	Aminosäuresynthese (Met)		
HUS2011C_1751	NAD(P)H-flavin oxidoreductase	b1462, ynfH	2.81	NAD(P)H-Flavinoxidoreduktase		
HUS2011C_1620	Transcriptional regulator, GA64/putrescine utilization cluster	b1299, putR	2.61	Regulator der Transkription		
HUS2011C_3672	hypothetical protein (consensus. sequence-1.134650..134659)	b0119, ynfC1	2.59	Vorläufer des glnV proteins		
HUS2011C_4138	Copper resistance protein B	b3024, ynfW	2.59	Vorläufer des glnV proteins		
HUS2011C_1687	Phenylacetate degradation enoyl-CoA hydratase PaaA	b1393, paaF	2.59	Kupferresistenzprotein		
HUS2011C_1337	Negative regulator of flagellin synthesis FlgM	b1071, flgM	2.54	FerriChromemetabolismus		
HUS2011C_3749	Periplasmic protein YnfC	b3097, ynfC	2.53	Regulation der Flagellinsynthese		
HUS2011C_0180	Undecaprenyl dipalophate synthase [EC	b0174, lpsU	2.52	Periplasmatisches Protein		
HUS2011C_4109	Lead, cadmium, zinc and mercury transporting ATPase; Copper translocating P-type ATPase (consensus. sequence-1.4093759..4095958)	b3469, zntA	2.48	Zellwandaufbau		
HUS2011C_1215	Mobile element protein (consensus. sequence-1.1247536..1248507)	b0259, insH; b0552, insH; b0656, b0968, ynfC	2.47	Blei-, Cadmium-, Zink-, Quecksilber-Transport		für reguliert
HUS2011C_4923	Aerobactin siderophore receptor iutA, TonB-dependent siderophore receptor		2.41	mobiles Elementprotein		
HUS2011C_1051	Acylphosphate phosphohydrolase [EC 3.6.1.7],	b1882, cheY	2.31	Aerobaktin-Siderophorerezeptor		für reguliert
HUS2011C_2358	Chemotaxis regulator - transmits chemoreceptor		2.31	Acylphosphatphosphohydrolase		
HUS2011C_3717	iron-chelator, utilization protein	b3070, ynfH	2.31	Regulator der Chemotaxis		
HUS2011C_2139	Periplasmic protein related to spheroblast	b1743, spv	2.31	Eisenchelatorutilisationsprotein		
HUS2011C_1985	Superoxide dismutase, [Cu-Zn] precursor (EC	b1646, sodC	2.25	Regulator der Transkription		
HUS2011C_4884	Alpha-galactosidase (EC 3.2.1.22)	b4119, msaA	2.25	Vorläufer der Superoxiddismutase (Cu-Zn)		
HUS2011C_2925	FG00638309: hypothetical protein	b2395, ynfA	2.23	Kohlenhydratmetabolismus		
HUS2011C_4450	Hexose phosphate transport protein UhpT	b3666, uhpI	2.21	Zuckerranporter		
HUS2011C_3962	LSU, ribosomal protein L24p (L2346)	b3318, rplW	2.21	Kleinteilprotein		
HUS2011C_4967	probable membrane protein ynfI	b4144, ynfI	2.20	Stressantwort		
HUS2011C_0206	Protein RcsF	b0196, rcsF	2.20	Protein RcsF		
HUS2011C_0450	Purative oxidoreductase (consensus. sequence-1.469275..470250)	b0419, ynfO	2.20	Oxidoreduktase		
HUS2011C_3278	Phosphoenolpyruvate sulfite reductase (thioredoxin)	b2762, cyfH	2.14	Sulfatassimilation		
HUS2011C_2117	6-phosphofructokinase class II (EC 2.7.1.11)	b1723, pfkF	2.13	Kohlenhydratmetabolismus		
HUS2011C_2956	6-aminohexanoate-dimer hydrolase [EC 3.5.1.46)	b2430, ynfaw	2.13	6-Aminohexanoaldimeryholase		
HUS2011C_3569	conserved hypothetical protein (consensus. sequence-1.3571592..3572837)		2.13			
HUS2011C_2650	RNA-dihydropyridine synthase C [EC 1.-.-.-]	b2140, dncC	2.13	RNA-Dihydropyridinsynthase		
HUS2011C_3873	Purative sugar isomerase involved in processing	b3221, ynfH	2.13	Kohlenhydratmetabolismus		
HUS2011C_4195	Purative regulator L (consensus. sequence-1.4185286..4185488)	b3520, ynfB	2.12	Regulation der Transkription		
HUS2011C_1693	Ornithically inducible lipoprotein B precursor	b1283, ornB	2.10	Lipoprotein-B-Vorläufer		
HUS2011C_2930	Xanthine operon regulatory protein XapR, LysR	b2405, xapR	2.10	Regulation der Transkription		
HUS2011C_1048	Succinyl-CoA synthetase, alpha subunit-related	b0865, ynfU	2.09	Succinyl-CoA-Synthetase		
HUS2011C_3017	Exported zinc metalloprotease YnfC-precursor	b2494, ynfC	2.08	Zinkmetalloproteasesorläufer		
HUS2011C_0956	Macrolide-specific efflux protein MacA	b3878, macA	2.07	Macrolidspezifisches Effluxprotein		
HUS2011C_2534	ATP-phosphoribosyltransferase [EC 2.4.2.17)	b2019, hnsG	2.06	Aminosäuresynthese (His)		

HUS2011C_2458	Iron acquisition verinibabactin synthesis enzyme		b1838, pphA	2.03 Eisenaquilisation-Verinibabaktinsynthese	
HUS2011C_2243	Serine/threonine protein phosphatase 1 (EC		b3409, feoB	2.02 Serine/Threonin-Phosphatase	
HUS2011C_4046	Ferrous iron transport protein B		b0259, inrH, b0552, inrH, b0656,	2.02 Fe ²⁺ -Transportprotein	für reguliert
HUS2011C_2125	Mobile element protein (consensus, sequence-1 2111868..2112849)		b2916, arfP	2.02 mobiles Elementprotein	
HUS2011C_3452	Chromosome initiation inhibitor (consensus, sequence-1 3452880..3453840)		b1981, shiA	2.01 Chromosomeninitiationsinhibitor	
HUS2011C_2468	Shikimate transporter (consensus, sequence-1 2432023..2433340)		b4191, ulrR	2.00 Shikimattransporter	
HUS2011C_5013	Ascorbate utilization transcriptional regulator UlaR, YTH-type		b4642, yoeD	2.00 Ascorbatmetabolismus, Transkriptionsregulation	
HUS2011C_4949	Mobile element protein (consensus, sequence-1 4977789..4978157)		b0488, ybbJ	1.99 mobiles Elementprotein	
HUS2011C_0526	PGO1107945: hypothetical protein		b1680, sufS	1.98 Cysteinemetabolismus	für reguliert
HUS2011C_2020	Cysteine desulfurase (EC 2.8.1.7), SufS		b1709, btdD	1.97 Vitamin B12-ABC-Transporter	
HUS2011C_2050	Vitamin B12 ABC transporter, ATPase component		b0259, inrH, b0552, inrH, b0656,	1.97 mobiles Elementprotein	
HUS2011C_2102	Mobile element protein (consensus, sequence-1 2092461..2093442)		b1020, phoH	1.97	
HUS2011C_1178	Phosphate scavange inducible protein PhoH, predicted ATPase		b3284, smg	1.96	
HUS2011C_1812	Protein of unknown function Smg		b1520, yneE	1.95	
HUS2011C_3929	Autoinducer 2 (AI-2) ABC transport system, periplasmic AI-2 binding protein LsrB		b1516, lsrB	1.94 ABC-Transporter	
HUS2011C_1908	Phenylacetate degradation enoyl-CoA hydratase PaaB		b1394, paaG	1.93 Phenylacetatabbau-Enoyl-CoA-Hydratase	
HUS2011C_1688	Adenine phosphoribosyltransferase		b0469, apt	1.93 Adeninhosphoribosyltransferase	
HUS2011C_0506	Purative sugar ABC transport system, periplasmic binding protein Ytq, precursor		b4227, yfYQ	1.93 Zucker-ABC-Transportsystem	
HUS2011C_2367	Flagellar transcriptional activator FlhC		b1891, flhC	1.91 Flagellenbiogenese	für reguliert
HUS2011C_0953	Aquaporin Z		b0875, aqpZ	1.90 Aquaporin Z	
HUS2011C_3921	Glutamate Aspartate transport system permease		b3270, ynfY	1.90 Glutamatasparratransportsystempermease	



95 Gene sind nach den Kriterien "mindestens 10 reads, Fold change ab 1,9 (gerundet auf 1,9) (gerundet auf zwei Nachkommastellen)" durch Dakapo hochreguliert

A13.2 Auswertung Transkriptomanalyse EAHCC (S13305, Gießen). Vergleich der Genregulation nach Behandlung mit dem Anthocyan-reichen Traubenextrakt Dokapo (inhibierte Gene)

Feature ID	Produkt (aus CLIC, beibehalten)	Expression in E. coli K12	Fold change	Funktion/Einordnung	Farbcodierung	Eisenmetabolismus
HUS2011C 0114	hypothetical protein (consensus, sequence=1.123157..123340)		-8.65			
HUS2011C 2548	FIG00641908: hypothetical protein		-7.02			
HUS2011C 2585	Purative chaparotin	b2070, yegI	-6.39	DNA-Reparatur		
HUS2011C 4889	Phosphothiohydantoin transferase EptA-specific	b4114, eptA	-5.73	Zellwandaufbau		
HUS2011C 4289	COG3209: Rns family protein (consensus, sequence=1.4281646..4284826)	b0497, rhsD, b0700, rnsC, b3482,	-5.49	Protein der Rns-Familie		
HUS2011C 2380	Ferritin-1	b1905, fnrA	-5.49	Eisenspeicherung		für reguliert
HUS2011C 5156	frnU(II) dicarboxylate transport protein FecA	b4291, fecA	-5.08	Eisen-III-dictratransport		für reguliert
HUS2011C 3667	Bacterioferritin	b3336, bfr	-4.95	Eisenspeicherung		
HUS2011C 4172	FIG00638311: hypothetical protein	b4289, fecC	-4.62			für reguliert
HUS2011C 5154	frnU(II) dicarboxylate transport system permease/protein FecC	b4288, fecD	-4.46	Eisen-III-dictratransport		für reguliert
HUS2011C 5153	frnU(II) dicarboxylate transport system permease/protein FecD	b0623, cspE, b0990, cspG, b1552,	-4.27	Kalkschockprotein		
HUS2011C 2227	putative antirepressor		-4.27	Antirepressor		
HUS2011C 5155	frnU(II) dicarboxylate transport system, periplasmic iron-binding protein FecB	b4290, fecB	-4.22	Eisen-III-dictratransport		für reguliert
HUS2011C 0021	SSU ribosomal protein S20p		-4.22	Ribonukleoprotein		
HUS2011C 4333	LSU ribosomal protein L33p	b3636, rplnG	-4.12	Ribonukleoprotein		
HUS2011C 3303	Programmed cell death toxin MazF	b2782, mazF	-3.99	Stressantwort		
HUS2011C 3533	Mobile element protein (consensus, sequence=1.3532986..3533172)	b4642, yoeD	-3.86	mobiles Elementprotein		
HUS2011C 2547	glycosyl transferase, group 1		-3.84	Kohlenhydratmetabolismus		
HUS2011C 0646	Gold shock protein CspE	b0623, cspE, b0990, cspG, b1552,	-3.77	Kalkschockprotein		
HUS2011C 3553	FIG00642671: hypothetical protein		-3.76			
HUS2011C 2549	N-acetylneuraminic acid synthase-like protein		-3.66	Zellwandaufbau		
HUS2011C 5223	FIG023911: putative membrane protein	b4364, yijP	-3.66			
HUS2011C 2804	Purative S-transferase	b2298, yf6C	-3.66			
HUS2011C 1097	Phage EcaA protein (consensus, sequence=1.1138539..1139436)		-3.52	Zelladhäsion		
HUS2011C 4874	Phu protein	b4098, phnI	-3.46	Alkylphosphonatansport		
HUS2011C 1998	hypothetical protein (consensus, sequence=1.1998913..1999033)		-3.44			
HUS2011C 0741	Succinate dehydrogenase cytochrome b-536 subunit		-3.42	Kohlenhydratmetabolismus		für reguliert
HUS2011C 0913	biofilm regulator BsrR	b0836, bsrR	-3.27	Biofilmentregulator		
HUS2011C 1104	FIG00640680: hypothetical protein		-3.27			
HUS2011C 2350	UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase (consensus, sequence=1.2502886..2504050)	b2833, ygdR	-3.19	Zellwandaufbau		
HUS2011C 3358	Hypothetical lipoprotein ygdR precursor		-3.18			
HUS2011C 3566	Co-activator of prothymine gene expression ltrB (consensus, sequence=1.3568859..3569187)		-3.14	Prophagenexpression		
HUS2011C 0288	Integrase (consensus, sequence=1.3051477..306425)		-3.14	Integrase		
HUS2011C 4294	GTase (consensus, sequence=1.4291381..4291744)	b3587, yiaW, b3598, yibI	-3.08	GTase		
HUS2011C 4939	COG3328: Transposase and inactivated derivatives		-3.05	Transposase		
HUS2011C 3224	Formate dehydrogenase maturation protein hvdH (consensus, sequence=1.3245340..3225251)	b2718, hvdH	-3.05	Hydrogenylase		
HUS2011C 5127	Ribokinase (EC 2.7.1.15) (consensus, sequence=1.5151736..5152657)		-3.05	Kohlenhydratmetabolismus		
HUS2011C 5209	FIG00638725: hypothetical protein		-3.03			
HUS2011C 3946	LSU ribosomal protein L30p (L76)	b3302, rplmD	-3.03	Ribonukleoprotein		
HUS2011C 3469	ATPase component S1T323 of energizing module of quiescence-regulated ECF transporter		-3.01	Transporter		
HUS2011C 0740	FIG00639598: hypothetical protein		-3.01			
HUS2011C 4972	Enteritidin B precursor	b4411, eonB	-3.00	Stressantwort		
HUS2011C 0037	Crotonobetainyl-CoA dehydrogenase	b0039, caIA	-2.97	Dehydrogenase		
HUS2011C 2711	Cytochrome c-type biogenesis protein CmcC, putative heme lyase for CmcE	b2199, cmcC	-2.96	Hämexport		
HUS2011C 2500	Transcriptional regulatory protein UtpA	b3669, utpA	-2.93	Zuckertransport		
HUS2011C 4433	Superoxide dismutase [Fe]	b1656, sodB	-2.85	Superoxiddismutase [Fe]		
HUS2011C 1996	SSU ribosomal protein S12p (S23e)	b3342, rpsL	-2.83	Ribonukleoprotein		
HUS2011C 3672	FIG00896075: hypothetical protein	b3029, ygiN	-2.83			
HUS2011C 2156	S-methyl-CTP pyrophosphohydrolase	b1759, nudG	-2.82	Pyrophosphohydrolase		
HUS2011C 2858	Phage integrase (consensus, sequence=1.2846037..2847195)	b2349, intS	-2.82			
HUS2011C 2934	Purative exported protein (consensus, sequence=1.752400..752607)	b2408, yf6N	-2.80			
HUS2011C 3950	LSU ribosomal protein L20p (L17a)	b3315, rplV	-2.79	Ribonukleoprotein		
HUS2011C 0380	2-hydroxy-6-ketone-2,4-dienediol acid hydrolase	b0349, mlgC	-2.75	Säurehydrolase		
HUS2011C 1357	LSU ribosomal protein L32p	b1083, rplmF	-2.71	Ribonukleoprotein		
HUS2011C 3712	SSU ribosomal protein S23p	b3065, rpsU	-2.70	Ribonukleoprotein		
HUS2011C 3955	FIG00641526: hypothetical protein (consensus, sequence=1.1180451..1181069)		-2.70	DNA-Integration, DNA-Rekombination		
HUS2011C 2342	Phage eae protein	b1579, intQ	-2.64	DNA-Integration, DNA-Rekombination		
HUS2011C 1100	Integrase (consensus, sequence=1.2300367..2301878)		-2.63	Zelladhäsion		
HUS2011C 4322	Oligosaccharide repeat unit polymerase Wzy, O-antigen ligase		-2.62			
HUS2011C 2860	Phage tail fiber (consensus, sequence=1.2849404..2851384)		-2.61	Kohlenhydratmetabolismus		
HUS2011C 4248	Gold shock protein CspA	b0623, cspE, b0990, cspG, b1552,	-2.61	Phagenschwanzfaserprotein		
HUS2011C 4437	hypothetical protein (consensus, sequence=1.4424779..4425031)		-2.60	Kalkschockprotein		
HUS2011C 4324	UDP-galactose(galactosyl) LP5		-2.59	Zellwandaufbau		
HUS2011C 3647	Ni/Fe-hydrogenase 2-B-type cytochrome subunit	b2995, hvdB	-2.58	Nickel-Eisen-Hydrogenase		
HUS2011C 4310	Transcriptional activator of cad operon	b4133, caIC	-2.58	Intrazelluläre Signaltansduktion		
HUS2011C 2110	LSU ribosomal protein L35p	b1717, rplmI	-2.57	Ribonukleoprotein		
HUS2011C 2523	Purative inner membrane protein (consensus, sequence=1.2475926..2476607)		-2.55			
HUS2011C 2716	Polyferredoxin NapH [periplasmic nitrate reductase]	b2204, napH	-2.54	Polyferredoxin		
HUS2011C 4436	hypothetical protein (consensus, sequence=1.4424524..4424683)		-2.51			
HUS2011C 2426	putative cytoplasmic protein	b1953, yodD	-2.51			
HUS2011C 1111	FIG00642438: hypothetical protein (consensus, sequence=1.1146738..1147512)		-2.51			

HUS2011C_1028	Dihydrodicate dehydrogenase		b0945, pyd	-2.48	Pyrimidinsynthese	for request
HUS2011C_2473	Alkanesulfonate utilization operon YnfK family		b1987, zbl	-2.48	Regulator der Transkription	
HUS2011C_0420	Cytoplasmic protein YnfE		b0391, ynfE	-2.47	Zytoplasomatisches Protein	
FIGD0641555	hypothetical protein			-2.46		
HUS2011C_2546	Cell division protein FtsL		b0083, ftsL	-2.44	Zellteilung	
HUS2011C_0083	Rho-specific inhibitor of transcription		b0189, rnf	-2.44	Regulator der Transkription	
HUS2011C_0196	Polyoxin resistance protein PmrD		b2259, pmrD	-2.44	Antibiotikaresistenz	
HUS2011C_2766	putative two-component response regulator and GGDEF family protein YnfJ		b1786, ynfJ	-2.40	Intrazelluläre Signaltransduktion	
HUS2011C_2183	Gamma-glutamyl-pyruvate synthetase		b1297, puuA	-2.40	Aminosäuresynthese (Glu)	
HUS2011C_1618			b1673, ynfH	-2.39		
FIGD0638117	hypothetical protein		b2900, ynfB	-2.38		
HUS2011C_3433	Protein Hfl 304		b0976, hnfE	-2.38	Hydrogaserhellungsfaktor	
FIGD0640343	hypothetical protein		b0352, mhpE	-2.37	abbau aromatischer Verbindungen	
HUS2011C_0752	Hydrogenase maturation factor HcoO/HnfE			-2.36		
HUS2011C_0383	4-Hydroxy-2-oxovalerate aldolase			-2.34	Oxidoreduktase	
HUS2011C_2101	hypothetical protein (consensus sequence=1.2091034...2.092204)		b2146, ynfT	-2.33	Vorläufer der Stigra-like toxin II subunit A	
HUS2011C_2658	pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase		b2161, nupX b2164, psuT	-2.31		
HUS2011C_2671	Probable pyrimidine nucleoside transport			-2.30		
HUS2011C_1125	Stiga-like toxin II subunit A precursor			-2.30		
HUS2011C_4229	hypothetical protein (consensus sequence=1.4221303...4.221447)			-2.30		
HUS2011C_0408	membrane protein YnfZ		b0380, ynfZ	-2.30	mobiles Elementprotein	
HUS2011C_04957	Mobile element protein (consensus sequence=1.4890775...4.992038)		b4271, infB	-2.30	mobiles Elementprotein	
HUS2011C_3140	Outer membrane lipoprotein SmpA, a component of the essential YnfF outer-membrane protein assembly complex		b2617, bafE	-2.30	Lipoprotein	
HUS2011C_3140	Outer membrane lipoprotein SmpA, a component of the essential YnfF outer-membrane protein assembly complex		b0186, ddcC; b1331, cdaA	-2.29		
HUS2011C_4908	Lysine decarboxylase, inducible		b0894, dmsA; b1587, ynfI; b1588, b0841, ynfG	-2.27	Oxidoreduktase	
HUS2011C_0972	Anaerobic dimethyl sulfoxide reductase chain A			-2.25	Permease	
HUS2011C_0918	putative permease (consensus sequence=1.948012...94.8609)			-2.25		
HUS2011C_3185	FIGD06381108: hypothetical protein			-2.24	Zuckentransport, PTS	
HUS2011C_2133	PEP-dependent phosphotransferase enzyme II for cellobiose, arbutin, and salicin		b1737, chnC	-2.23	Elektronentransportprotein	
HUS2011C_5059	Soluble Cytochrome b562		b4256, cybC	-2.23	Zuckentransport	
HUS2011C_4522	Ribose ABC transport system, permease protein RbsC (consensus sequence=1.4511823...45.12789)		b3750, rbsC	-2.23		
HUS2011C_3491	LPF0301 protein YnfE		b2948, ynfE	-2.23		
HUS2011C_3476	Transketolase (consensus sequence=1.3475972...34.77964)		b2465, tdkB; b2935, tdkA	-2.22	Transketolase	
HUS2011C_0267	Xanthine-kumline phosphoribosyltransferase (EC		b0238, gpt	-2.21	Purinnucleobolismus	
HUS2011C_5133	Mobile element protein (consensus sequence=1.5154929...5.156542)			-2.20		
HUS2011C_0757	4-Hydroxybenzoyl-CoA thioesterase family active		b0736, ynfC	-2.20	Phospholipidmetabolismus	
HUS2011C_4274	L-xylulose/3-keto-L-gulonate kinase (EC		b3580, ynfK	-2.20	Kohlenhydratmetabolismus	
HUS2011C_5000	Nitrite-sensitive transcriptional repressor		b4178, nsrR	-2.20	Schutz vor nitrosativem Stress	
HUS2011C_2937	Putative cytoplasmic protein (consensus sequence=1.2958200...29.58419)		b4546, ynfB	-2.20		
HUS2011C_3991	Para-aminobenzoate synthase, amidotransferase component PabAB		b3360, paba	-2.18	Glutaminmetabolismus	
HUS2011C_5082	Uncharacterised acetyltransferase YfgM		b4256, yfgM	-2.17	Helikase	
HUS2011C_1118	Putative ATP-dependent helicase		b3311, rpsQ	-2.17	Ribonukleoprotein	
HUS2011C_3955	SSU ribosomal protein S17p (S17e)		b3936, rpmE	-2.16	Ribonukleoprotein	
HUS2011C_4705	LSU ribosomal protein L31p (consensus sequence=1.4704971...47.051184)			-2.16		
HUS2011C_3966	Leader peptidase (Nre) (peptidase)/N-methyltransferase (consensus sequence=1.3952946...39.53414)		b2927, epd	-2.15	Pyridoxinsynthese	
HUS2011C_3464	O-erythrose-4-phosphate dehydrogenase		b2619, yfjG	-2.15	Transportprotein	
HUS2011C_3142	putative oligoacetyl cyclase/dehydrolase or lipid transport protein YifG			-2.15	Nickeltransport	
HUS2011C_3054	hypothetical protein (consensus sequence=1.3052240...3.052357)		b3480, nfkE	-2.15	Ribonukleoprotein	
HUS2011C_4120	Nickel transport ATP-binding protein NfkE			-2.15		
HUS2011C_3960	SSU ribosomal protein S19p (S1Se)			-2.15		
HUS2011C_2521	putative inner membrane protein (consensus sequence=1.2474269...24.74692)		b0772, zdhD	-2.14	Kohlenhydratmetabolismus	for request
HUS2011C_0742	Succinate dehydrogenase subunit D		b3653, tmaA	-2.13	Methyltransferase	
HUS2011C_4740	rRNA (Uracil)-C5-methyltransferase		b0120, spdD	-2.13	Polyaminiidsynthese	



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6229-3

